

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Modelos animales para el estudio de factores de vulnerabilidad en el
contexto de desórdenes neuropsiquiátricos y de adicción a drogas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Álvaro Llorente Berzal

Directoras

M^a Paz Viveros Hernando
Eva M^a Marco López

Madrid, 2014

TESIS DOCTORAL

**MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE
FACTORES DE VULNERABILIDAD EN EL
CONTEXTO DE DESÓRDENES
NEUROPSIQUIÁTRICOS Y DE ADICCIÓN A
DROGAS**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MADRID

ÁLVARO LLORENTE BERZAL

Año 2013

M^a Paz Viveros Hernando, Catedrática de la Universidad Complutense de Madrid, y
Eva M^a Marco López, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad Complutense de
Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Modelos animales para el estudio de factores de vulnerabilidad en el contexto de desórdenes neuropsiquiátricos y de adicción a drogas**” presentada por Álvaro Llorente Berzal, licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado a 5 de
Noviembre del 2013

Dra. M^a Paz Viveros

Dra. Eva M^a Marco

La presente tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. M^a Paz Viveros Hernando y la codirección de la Dra. Eva M^a Marco López.

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Plan Nacional sobre Drogas Orden SAS/1250/2009, Red de Trastornos Adictivos (RD06/0001/1013 y RD12/0028/0021), Grupos UCM-BSCH: 951579 y el Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud. Álvaro Llorente Berzal también fue dotado con una Beca predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) (convocatoria 2008).



“Mientras el cerebro sea un misterio, el universo seguirá siendo un misterio.”

Santiago Ramón y Cajal

“El más terrible de los sentimientos es el sentimiento de tener la esperanza perdida.”

Federico García Lorca

AGRADECIMIENTOS

En la vida existen etapas que has de empezar, y lo que es más importante, terminar, para poder avanzar hacia una nueva aventura. En este sentido, al presentar esta Tesis me siento que estoy cerrando una etapa muy importante de mi vida, en la que he sufrido y he trabajado como nunca antes, pero al mismo tiempo me ha ofrecido alegrías, sueños, esperanzas, conocimientos y grandes experiencias, y sobre todo la posibilidad de conocer nuevas personas que junto a las ya conocidas en etapas anteriores me han ayudado a sobrellevar los baches de los últimos años.

Vale comenzar con mi principal mentora y creo que también amiga, ya que para que se pueda hablar de amistad se necesita reciprocidad, la **Dra M^a Paz Viveros**. De ella puedo destacar su gran perseverancia y entrega en el trabajo, consiguiendo así que el grupo que dirige tenga una trayectoria tan positiva como la que tiene. Pero además, posee ese factor humano, tan imprescindible en los tiempos que corren y que a mí personalmente siempre me ha brindado.

A la **Dra Eva M^a Marco**, porque su gran paciencia y la forma de dirigir el trabajo me han ayudado a comprender lo difícil que es estar en la ciencia. También tengo mucho que agradecer a la **Dra Meritxell López**, quien siempre ha estado allí para escucharme, cosa que aunque puede parecer poco es en realidad de gran ayuda. También a la **Dra Carmen Prada**, quien siempre me ha ofrecido consejos muy útiles en el día a día del laboratorio y a **Ángela** que me amenizaba con sus charlas el tedio de algunos experimentos.

Hay además en mi grupo de investigación un gran número de “personejas” sin las cuales no hubiese podido sobrevivir todo este tiempo. En primer lugar tengo que hablar del ilustrísimo **Dr Ricardo Llorente**, mejor conocido como Ri, con el que he compartido infinidad de horas de laboratorio y conversaciones, muchas de ellas de besugos, y que me enseñó cómo iba esto de la ciencia en un principio. Pero a quien más tengo que agradecer es a “mis becarias”, las chiquillas con las que fundaré el triángulo del amor y las niñas que me han pintado corazoncitos, florecillas e historietas en las botellas de Pirex, **Ana** y **Virginia**, gracias wapísimas por nuestras charlas kafkianas. **Eri** también tiene un lugar en estos agradecimientos, porque no sólo sus tartas

endulzaban el día sino también su vitalidad y su simpatía. Agradecer a **Sara**, porque sin sus “saras” el laboratorio sería un lugar menos alegre y a **Lara** por estar ahí escuchando. También quiero agradecer a todos aquéllos que formaron parte de mi vida laboratoril y que se fueron antes de que yo acabara: **Laura, Bea, Noé, Celia, Marcos, Álex, Patricia, Manu.**

Indudablemente el gran número de horas que he tenido que pasar en el Departamento de Fisiología Animal ha hecho que conozca a los profesores que allí trabajan y por supuesto a **Ana**, quien siempre te ofrece un enorme buenos días que te alegra la mañana. En el departamento también pude conocer a gente que se encontraba en la misma situación laboral que yo, gente fantástica con la que he pasado tiempo no sólo en la facultad, sino también fuera de ella. Agradecer a **Inés** y a **Alexia** por toda la paciencia demostrada cuando iba a darles el coñazo en mis momentos improductivos, a **Clarita**, porque sin ella el mundo sería un lugar sombrío, a **Pilar** y a **Lorena**, porque mis primeros años con ellas fueron divertidísimos, a **Gelen**, por ser tan genial como es, y como tampoco puedo eternizarme... **Laura, Ana, Aída, Miguel, Aye, Jose, Ianire, Julia, Estefanía, Emma**, muchas gracias a todos.

Jamás hubiera conseguido sobrevivir sino hubiese tenido una vida también fuera del mundo científico. Tengo que agradecer a mis amigos de la “vida real” el hecho de estar ahí y existir. A **Alba** y a **Alberto** porque siempre he tenido las puertas de su casa abiertas para reuniones sociales, a **Sara**, porque nunca antepuso sus problemas a los de ningún otro, a **Alba** y a **Yazmi**, porque sin ellas la carrera hubiera sido muy aburrida, y a un puñado más de personas como son **Silvia, Santi, Jessi, María**, etc...

A pesar de tener una “vida real”, algunas veces he necesitado desconectar del todo. Es por eso que siempre que puedo voy a mi pueblo (La Velilla, Segovia) donde la cobertura y el WiFi son tan escasos como la financiación actual a la ciencia. Un besazo enorme a mi prima **Silvia**, y a **Marta**, porque hacen que las fiestas del pueblo sean más cálidas de lo que realmente son. Y no puedo acabar este párrafo sin hacer una mención especial para mi prima **Leti** quien ha diseñado la portada de esta Tesis, muchas gracias.

Due to the fact that I love to travel and meet new people I've been able to do a lot of friends in several scientific visits I've done. **Emmanuel Onaivi** was the first one to let me enter in his lab at the William Paterson University in Wayne (NJ, USA). I really appreciate from him his kindness and his baritone voice saying “amigo” when I

was working. I really miss that much although it scared me as hell. **Patricia**, que es la mujer más dulce, simpática y hospitalaria que jamás hubiera pensado conocer nunca. **Norman**, whose jokes and speeches helped me to better understand the American accent. And finally, thanks to the undergraduate students who were helping me with my experiments: **Mersi**, **Evadney** and **Leizl**.

Estic molt content també de la meva estada a la UAB. Allí vaig treballar amb la **Roser Nadal** qui em va posar amablement un matalàs a l'estabulari, però això no em va importar massa perquè és una persona fantàstica y força amable. De l'**Antonio Armario** dir que té una conversa molt agradable i que mola veure'l llegir muntanyes de papers. He d'agrair també a la meva colla per a sortir per Barcelona, el **Xavi**, la **Yas**, la **Bea**, la **Mar**, l'**Humberto**, i a tots els amics que vaig fer allí: la **Núria**, la **Cristina Muñoz**, la **Cristina Rabasa**, la **Silvia**, el **Nacho**, la **Gemma**.

Por supuesto, agradecer al **Dr Emilio Ambrosio** el haberme abierto las puertas de su laboratorio. Y por supuesto a **Alejandro** y a **Amparo** por toda su ayuda durante mi estancia en la UNED.

Undoubtedly, however, my best scientific visit was in Munich. I worked in the lab of **Dr Carsten Wotjak** who's a great professional but with all the good things of being a nice person as well. There, I also met really nice people who helped me to adapt to the new lab and to the German-related environmental conditions such as **Vincenzo**, **Gaby**, **Andrés**, **María**, **Ana**, **Carlos**, **Yi-Chun**, **Judith**, **Anja**, etc. También tuve la suerte de poder hacer un grupo de amigos españoles con los que hice una gran vida social y con quienes vi ganar a España el Europeo de 2012, muchas gracias por vuestra amistad **Mercè** (la millor veïna del món), **Pol**, **Tamara**, **Gema**, **Almu**, **Aldo**, **Lidia**, **Ingrid**, **Pablo**, **Vera**, **Andreu**, **Carlos**.

Tan solo creo que me dejo ya al factor consanguíneo. Desde aquí quiero agradecer a mis tíos y a mis primos porque a pesar de no tener ni pajorela idea de lo que he estado haciendo estos últimos años, siempre he podido recibir su apoyo incondicional. A mi hermano **Arturo**, lo primero alabar su tenacidad a la hora de intentar que me vaya de casa, y lo segundo decirle que a pesar de todo sé que me quiere y que me respeta aunque sea desde las sombras. A **Gema** agradecerle dos cosas, que sea tan simpática y maja, pero sobre todo que tenga controlado a mi hermano. Un saludo al **Simba**, el cual sólo me hace caso cuando faltan Gema y Arturo. Y por último, quiero

dar las gracias a la razón de todo, a aquéllos que no sólo me dieron la vida, sino que me dieron una educación, me dieron apoyo incondicional, me dieron todos sus recursos para que yo terminara malgastando la vida haciendo una Tesis Doctoral... muchas gracias papá y mamá (i.e. **Fernando e Isabel**), vosotros sí que habéis sido los artífices reales de todo este trabajo.

Así que, como ya digo gracias a todos aquéllos que han estado en mis malos y en mis buenos momentos, tanto a los nombrados en esta sección de agradecimientos como a aquéllos que por falta de espacio he tenido que dejar a un lado. Muchas gracias y esta Tesis va por todos vosotros.

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
5-HIAA	Ácido 5-hidroxitindolacético
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AEA	Anandamida
Arc	Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CBT	Terapia cognitiva-conductual
CP	CP-55,940
CPP	Preferencia condicionada de lugar
CRF	Factor liberador de corticotropina
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DARPP-32	Fosfoproteína neuronal regulada por c-AMP y dopamina de peso molecular 32 kDa
DP	Día postnatal
DSI	Despolarización inducida por supresión de la inhibición
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos
FJ-C	Fluoro Jade-C
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HHa	Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1β	Interleukina-1 β
KO	<i>Knock-out</i>
LCE	Laberinto en cruz elevado
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MBDB	N-metil-1-3,4-metilenodioxifenil-2 butamina

ABREVIATURAS

MBP	Proteína básica de la mielina
MDA	3,4-metilendioxiánfetamina
MDEA	3,4-metilendioxietylamfetamina
MDMA	3,4-metilendioxi metanfetamina
NAA	N-acetil aspartato
NADA	N-araquidonoil-dopamina
NAPE-PLD	Fosfolipasa D dependiente de la N-acilfosfatidiletanolamina
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NK	<i>Natural killer</i>
NOT	Test de reconocimiento de objetos
NPY	Neuropéptido Y
OEA	Oleiletanolamida
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PEA	Palmitoiletanolamida
pERK	Fosfo-quinasas reguladas por señal extracelular
PPAR	Receptor activador de la proliferación de los peroxisomas
PPI	Test de la inhibición prepulso
PTSD	Trastorno de estrés postraumático
SEC	Sistema endocannabinoide
SERT	Transportador de serotonina
SHRP	Periodo de hiporreactividad al estrés
SM	Separación materna
TCA	Tablero con agujeros
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1

RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	27
1. PERIODOS CRÍTICOS DEL DESARROLLO	29
1.1. El estrés perinatal y el modelo de separación materna temprana	31
1.2. La adolescencia como periodo de vulnerabilidad	40
2. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	44
2.1. Componentes del sistema endocannabinoide	44
2.2. Principales funciones del sistema endocannabinoide	48
3. LA ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO	53
3.1. El cannabis	56
3.2. La cocaína	59
3.3. El éxtasis	61
4. CONDICIONAMIENTO Y EXTINCIÓN DEL MIEDO	64
4.1. Las respuestas de miedo	65
4.2. Alivio del miedo	68
4.3. Extinción de memorias y adicción a drogas	73
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
BLOQUE I. MODELO DE LOS DOS IMPACTOS: SEPARACIÓN MATERNA Y CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO DURANTE LA ADOLESCENCIA	85
Capítulo 1. Consecuencias, a largo plazo, de la exposición de ratas macho y hembra a separación materna neonatal y/o a un agonista cannabinoide en edad juvenil	87
Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, López-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, Nadal R (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. Addict Biol 16:624-37.	95
López-Gallardo M, López-Rodríguez AB, Llorente-Berzal Á , Rotllant D, Mackie K, Armario A, Nadal R, Viveros MP (2012). Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. Neuroscience 204:90-103.	109

Capítulo 2. La separación materna modula la preferencia condicionada de lugar a MDMA de una manera sexo-dependiente. Correlatos neuroquímicos	127
Llorente-Berzal A , Manzanedo C, Daza-Losada M, Valero M, López-Gallardo M, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Viveros MP (2013). Sex-dependent effects of early maternal deprivation on MDMA-induced conditioned place preference in adolescent rats: possible neurochemical correlates. <i>Toxicology</i> 311:78-86.	131
Capítulo 3. Efectos a largo plazo de la administración de cocaína durante el período periadolescente sobre receptores cannabinoides CB1 y CB2 en un modelo animal de separación materna temprana en ratas de ambos sexos.	143
Llorente-Berzal A , Assis MA, Rubino T, Zamberletti E, Marco EM, Parolaro D, Ambrosio E, Viveros MP (2013). Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure. <i>Pharmacol Res</i> 74:23-33.	147
BLOQUE II. MODELO DE EXPOSICIÓN COMBINADA A CANNABIS Y ÉXTASIS DURANTE LA ADOLESCENCIA	163
Capítulo 4. Efectos, a largo plazo, de la exposición en edad adolescente a THC y/o a MDMA: Dimorfismos sexuales	165
Llorente-Berzal A , Puighermanal E, Burokas A, Ozaita A, Maldonado R, Marco EM, Viveros MP (2013). Sex dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption. <i>Plos One</i> . In Press.	173
López-Rodríguez AB, Llorente-Berzal A , Garcia-Segura L, Viveros MP (2013). Sex dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. <i>Br J Pharmacol</i> . In Press.	233
BLOQUE III: MODELO ANIMAL DE MIEDO EXTREMO E IMPLICACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	281
Capítulo 5. Estudio de la actividad del sistema endocannabinoide en un modelo animal de miedo extremo	283
Llorente-Berzal A , Terzian ALB, Viveros MP, Wotjak CT (2013). Pharmacological enhancement of anandamide and 2-AG levels modifies the expression of conditioned fear in opposite directions. <i>Neuropsychopharmacology</i> . Submitted	287

DISCUSIÓN	327
1. EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y LA EXPOSICIÓN CRÓNICA DURANTE LA ADOLESCENCIA A UNA DROGA DE ABUSO	329
1.1. Consecuencias de la separación materna neonatal y la administración del agonista cannabinoide CP-55,940 en edad juvenil	329
1.2. Modulación por parte de la separación materna temprana de la preferencia de lugar condicionada inducida por MDMA	339
1.3. Cambios en la expresión y funcionalidad de los receptores CB1 en el cerebro y la expresión del receptor CB2 en tejido inmune como consecuencia de la separación materna y una exposición adolescente a cocaína	345
2. EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA EXPOSICIÓN EN EDAD ADOLESCENTE A THC Y/O MDMA	351
3. LA ANANDAMIDA Y EL 2-ARAQUIDONILGLICEROL MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE MIEDO CONDICIONADO EN SENTIDOS OPUESTOS	370
4. COMENTARIOS FINALES	380
CONCLUSIONES	385
ENGLISH VERSION	391
SUMMARY	393
CONCLUSIONS	401
BIBLIOGRAFÍA	405
ANEXOS	
ANEXO I. MODELOS ANIMALES EMPLEADOS	451
ANEXO II. ANTICUERPOS Y FÁRMACOS UTILIZADOS	465
ANEXO III. PRUEBAS CONDUCTUALES EMPLEADAS	475
ANEXO IV. OTRAS PUBLICACIONES	489
Liu QR, Pan CH, Hishimoto A, Li CY, Xi ZX, Llorente-Berzal A , Viveros MP, Ishiguro H, Arinami T, Onaivi ES, Uhl GR (2009).Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. Genes Brain Behav. 8(5):519-30.	491

- Onaivi ES, Benno R, Halpern T, Mehanovic M, Schanz N, Sanders C, Yan X, Ishiguro H, Liu QR, **Berzal AL**, Viveros MP, Ali SF (2011).Consequences of cannabinoid and monoaminergic system disruption in a mouse model of autism spectrum disorders. Curr Neuropharmacol 9(1):209-14. 503
- Viveros MP, Llorente R, Suarez J, **Llorente-Berzal A**, López-Gallardo M, de Fonseca FR (2012).The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. J Psychopharmacol 26(1):164-76. 509
- Llorente-Berzal A**, Mela V, Borcel E, Valero M, López-Gallardo M, Viveros MP, Marco EM (2012).Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. Neuropharmacology 62(3):1332-41. 523

Título de la Tesis Doctoral: Modelos animales para el estudio de factores de vulnerabilidad en el contexto de desórdenes neuropsiquiátricos y de adicción a drogas

Durante la maduración del organismo han sido descritos periodos críticos, o lo que es lo mismo, “ventanas de vulnerabilidad”, en las que el individuo, y más particularmente su cerebro, están en pleno desarrollo y durante los cuales ciertas influencias tanto ambientales como farmacológicas pueden provocar cambios neuroendocrinos y conductuales a largo plazo. Por ejemplo, la separación o el abandono por parte de los progenitores, el estrés social, la presencia de abusos físicos o sexuales, o el consumo abusivo de drogas en determinadas etapas de la vida se relacionan con la aparición de alteraciones del desarrollo de varios sistemas neurobiológicos y pueden ser la causa de alteraciones estructurales y funcionales a largo plazo en el cerebro tanto en los seres humanos como en los animales. Uno de los modelos animales mejor estudiados de estrés en etapas tempranas de la vida es la separación materna temprana (SM) que consiste en separar a la madre de sus crías durante 24 horas a día postnatal (DP) 9 y que ha sido intensamente caracterizado en nuestro grupo. Sin embargo, y en contraste con otros modelos de estrés perinatal temprano, no existe apenas información sobre las posibles alteraciones que pueda producir este modelo de SM sobre los efectos de las drogas de abuso a largo plazo.

El inicio de consumo de drogas suele producirse durante el periodo periadolescente, debido, entre otros factores, a los cambios emocionales que sufre el cerebro adolescente y a las conductas características de esta etapa del desarrollo, tales como la búsqueda de novedad o de “sensaciones nuevas”, el aumento en la frecuencia de conductas de riesgo y una mayor impulsividad. Durante esta etapa de la vida se produce la maduración y reorganización de la mayor parte de los sistemas de neurotransmisión y estudios experimentales en modelos animales de adolescencia apoyan la idea de que esta etapa del desarrollo representa otra “ventana de vulnerabilidad”. De hecho es en torno a este período de la vida cuando debutan síntomas de diversas enfermedades psiquiátricas, incluida la adicción.

La adicción a drogas es un estado persistente caracterizado por una compulsión a buscar y consumir la droga, una pérdida de control en el límite del consumo, incluso cuando puede provocar importantes efectos deletéreos, y por la aparición de una sintomatología emocional negativa cuando no se puede acceder a la droga. Se sabe que el sistema dopaminérgico está íntimamente implicado en el desarrollo de adicción a las drogas, ya que la mayoría de éstas provocan un aumento de dopamina extracelular en el núcleo accumbens, sin embargo, existen estudios que demuestran la implicación de otros sistemas de neurotransmisión tales como el serotoninérgico, el GABAérgico, el opioide y el glutamatérgico. En los últimos años, además, se han acumulado evidencias acerca de la importante participación del sistema endocannabinoide (SEC) en la adquisición y mantenimiento de la conducta de consumo de drogas.

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema neuromodulador que está involucrado en una miríada de procesos fisiológicos, entre los que pueden destacarse el control motor, la analgesia, el aprendizaje y la memoria, la homeostasis emocional, la regulación del sistema inmunológico, la ingesta y el metabolismo energético. En lo que respecta a su implicación en la tolerancia y dependencia a las drogas de abuso, se sabe que la modulación genética o farmacológica del SEC induce cambios en los efectos reforzantes de las drogas y que el consumo de drogas produce alteraciones en el SEC, como por ejemplo, alteraciones en los niveles de endocannabinoides o en la expresión o actividad de los receptores cannabinoides.

Uno de los problemas para el tratamiento de la adicción son las recaídas, fenómeno que puede darse meses e incluso años después del último consumo de la droga. Estas recaídas están normalmente relacionadas con etapas de estrés y/o ansiedad que hacen que afloren memorias relacionadas con la adicción y, por ende, el hábito de consumo de la droga. A este respecto, se ha visto que el SEC juega un papel prominente en los procesos de extinción de memorias, lo que convierte a este sistema en una diana terapéutica potencial para el aumento de la eficacia de una terapia de extinción para la adicción. Sin embargo, los modelos animales de extinción de memorias presentan una importante limitación, como es la imposibilidad de testar tratamientos crónicos.

El primero de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue el de estudiar las posibles interacciones entre un estrés en edades tempranas del desarrollo, mediante el

uso del modelo de SM, y el consumo crónico de drogas en la etapa adolescente y sus relaciones con los desórdenes neuropsiquiátricos, incluida la adicción. Para ello, empleamos las drogas que con mayor frecuencia reportan haber consumido los jóvenes: el cannabis, el éxtasis y la cocaína.

En el primer experimento, ratas Wistar, de ambos sexos, fueron sometidas a la SM (24 horas a DP 9) y a un tratamiento crónico durante la adolescencia con el agonista cannabinoide CP-55,940 (CP; 0,4 mg/kg; DP 28-42) para mimetizar un consumo crónico adolescente de cannabis. Las respuestas tanto fisiológicas como conductuales a ambos desafíos fueron evaluadas en la etapa adulta. Los animales fueron sometidos al test de la inhibición prepulso (PPI; del inglés *prepulse inhibition*) de la respuesta de sobresalto y se analizó su actividad exploratoria en el tablero con agujeros (TCA) y sus niveles de ansiedad en el laberinto en cruz elevado (LCE). Además, se evaluó la reactividad adrenocortical en respuesta al estrés así como los niveles plasmáticos de leptina. Se midió, asimismo, la conducta materna antes y después del protocolo de SM. Observamos un aumento de la conducta materna, debida al protocolo de SM, tras la reunión de las crías con sus madres. En la etapa adulta, la SM pareció reducir la ansiedad o aumentar la conducta de riesgo en los animales macho, mientras que la exposición adolescente al agonista cannabinoide no produjo unos efectos conductuales significativos. En las hembras, la exposición adolescente al cannabinoide pareció promover conductas de búsqueda de la novedad y una disminución de la capacidad de atención en los animales adultos. Los rasgos de personalidad asociados con la búsqueda de novedad y la toma de riesgos podrían incrementar la probabilidad de consumo de diversas drogas de abuso. En conjunto, los presentes resultados sugieren que tanto la SM como un tratamiento cannabinoide durante la adolescencia podrían incrementar la vulnerabilidad a desarrollar ciertos trastornos psiquiátricos tales como psicosis o adicción a drogas.

En el estudio inmunohistoquímico del hipocampo de estos animales observamos que, en los machos, la SM produjo un incremento significativo del número de células positivas para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, del inglés *Glial fibrillar acidic protein*) en las áreas CA1 y CA3, así como en la capa polimórfica del giro dentado (GD). En estas dos últimas regiones, el tratamiento con CP tendió a contrarrestar el efecto de la SM. El tratamiento con CP causó, en los machos control no-separados, un

aumento significativo del número de células GFAP+ en la capa polimórfica del GD. A la vista de estos resultados, podríamos sugerir que los machos fueron más vulnerables que las hembras a los efectos que tienen sobre los astrocitos del hipocampo el protocolo de SM y el tratamiento juvenil con un agonista cannabinoide. En cuanto al receptor cannabinoide CB1, la SM produjo una disminución de la expresión de este receptor tanto en machos como en hembras. A su vez, el tratamiento adolescente con CP causó en los machos no-separados una disminución general de la inmunorreactividad a CB1, más marcada en CA1 y en la capa polimórfica del GD. Sin embargo, cuando se compararon las hembras no-separadas tratadas con CP con las no tratadas se observó en las primeras una tendencia a un incremento de la inmunorreactividad hipocampal por el receptor CB1. Los animales macho que recibieron ambos tratamientos mostraron una cierta “normalización” de la expresión hipocampal de CB1, lo cual nos indica la existencia de interacciones funcionales entre la SM neonatal y la exposición adolescente con un agonista cannabinoide. Este mismo tipo de interacción funcional se observó cuando estudiamos la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*), dado que la tendencia al aumento de su inmunorreactividad causada por el tratamiento con CP se vio contrarrestada por el protocolo de SM. Los presentes resultados resaltan la importancia funcional de los astrocitos y su interacción con el SEC respecto a las consecuencias a largo plazo de la exposición adolescente al cannabis.

En el siguiente experimento, utilizamos el paradigma de la preferencia condicionada de lugar para estudiar la influencia de la SM sobre los efectos reforzantes de la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) en animales adolescentes de ambos sexos. Los animales fueron condicionados con 2,5 mg/kg de MDMA durante el periodo periadolescente (DP 34-43) y se sacrificaron entre los DP 68 y 75. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la SM reduce los efectos reforzantes de la MDMA de una manera sexo-dependiente, efecto que podría estar relacionado con las alteraciones observadas en los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide. De hecho, los animales macho separados tratados con MDMA mostraron una reducción de los niveles de serotonina en corteza y en estriado, así como un aumento de la expresión hipocampal de receptores CB1, respecto a los no separados.

Por último, investigamos las consecuencias de la SM y/o la exposición adolescente a cocaína sobre los receptores CB1 cerebrales y los receptores CB2 en tejido inmune. Se les administró a ratas *Wistar* control y separadas, de ambos sexos, cocaína (8 mg/kg/día) o solución salina durante la adolescencia (DP 28-42). En la etapa adulta, se emplearon técnicas de *binding*; unión de [³H]-CP-55,940 para el análisis de la densidad de receptor CB1 y unión de [³⁵S]-GTPγS estimulada por CP-55,940 para el análisis de su funcionalidad; la expresión del receptor CB2 fue analizada por *Western blot*. Se encontraron diversas diferencias sexuales en la expresión y funcionalidad del receptor CB1, y se observó que la SM produjo relevantes y persistentes alteraciones sexo-dependientes. Además, el tratamiento adolescente con cocaína causó diversos cambios sobre el receptor CB1, y estos cambios se vieron diferencialmente influenciados por el estrés neonatal. La SM produjo un aumento de la expresión de receptor CB2 en el bazo mientras que la administración adolescente con cocaína atenuó tal efecto; la exposición a cocaína también produjo una disminución de la expresión del receptor CB2 en la médula ósea. Los presentes resultados demuestran la existencia de interacciones funcionales entre el desafío de la SM temprana y el tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia. En muchas regiones, los efectos observados fueron dependientes del sexo.

La segunda meta que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral fue la de estudiar las consecuencias a largo plazo del consumo combinado de cannabis y éxtasis durante la adolescencia. Con este propósito, tratamos a ratas *Wistar* adolescentes, tanto machos como hembras, con dosis crecientes de Δ⁹-tetrahidrocannabinol (THC; 2,5, 5, 10 mg/kg; i.p.) entre los DP 28 y 45 y/o con MDMA (dos dosis diarias de 10 mg/kg cada 5 días; s.c.) desde el DP 30 al DP 45. Observamos que la MDMA causó, en ambos sexos, una reducción de la exploración dirigida a estímulos en el TCA y un incremento de la exploración de los brazos abiertos en el LCE un día después del final del tratamiento farmacológico. A largo plazo, se observó una alteración de la función cognitiva, medida en el test de reconocimiento de objetos, debida al tratamiento con THC en las hembras, pero no en los machos. En el PPI, los animales macho y hembra tratados con MDMA mostraron una disminución del porcentaje de PPI a la mayor intensidad de prepulso testada (80 dB), mientras que la combinación de la MDMA con el THC ocasionó una disminución similar a 75 dB. El tratamiento con THC produjo una

disminución de la expresión hipocampal de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc; del inglés *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) en ambos sexos mientras que en el córtex frontal, esta reducción sólo se encontró en las hembras. Respecto a la inmunorreactividad de las fosfo-quinasas reguladas por señal extracelular (pERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinases*), la MDMA indujo una regulación a la baja en el córtex frontal de los animales macho, pero no en el de las hembras. En el hipotálamo, el THC disminuyó los niveles de ARNm para la prepro-orexina en los machos, y este efecto se vio revertido en los animales que recibieron ambas drogas. Datos previos han sugerido que tras la administración aguda de THC y MDMA podría observarse una “compensación” de ciertos efectos. Sin embargo, el modelo animal utilizado en este estudio mimetiza los hábitos actuales de consumo por parte de los jóvenes adolescentes y puede ofrecernos una imagen más fidedigna de las consecuencias deletéreas del policonsumo que el empleo de experimentos con tratamientos agudos, en particular en lo que se refiere al cannabis y el éxtasis, que son combinados en una alta frecuencia entre los adolescentes. Mientras que algunos de los efectos deletéreos de una de las dos drogas pueden verse contrarrestados durante la exposición inicial a la droga, como por ejemplo la temperatura corporal; tras una exposición repetida las consecuencias a largo plazo parecen ser exactamente opuestas, es decir, los animales que reciben ambas drogas son los que se encuentran más gravemente afectados.

Cuando realizamos el estudio de ambos tratamientos sobre indicadores de neuroinflamación (células gliales) y de los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide, encontramos que el tratamiento con THC produjo un aumento significativo de GFAP en ambos sexos. En los machos, ambas drogas, bien por separado o en combinación, causaron un aumento significativo del porcentaje de células de microglía reactiva (Iba-1). Sin embargo, en hembras, cada droga causó, por sí misma, una disminución de este porcentaje, mientras que la combinación de ambos tratamientos dio lugar a una “normalización” a los niveles de las hembras control. En ambos sexos, la MDMA produjo una disminución del número de fibras positivas para el transportador de serotonina y la combinación de ambas drogas revirtió tal efecto. Respecto al receptor CB1, el tratamiento con THC originó una reducción significativa de este receptor en las hembras, efecto que se vio agravado por la combinación con MDMA.

Por último, quisimos caracterizar un modelo animal de miedo cuya respuesta de *freezing*, o respuesta conductual al miedo, no declinara tras varios días de extinción. Para ello, el día del condicionamiento, los animales fueron expuestos a un estímulo altamente aversivo, i.e. un *shock* eléctrico de 1,5 mA, y posteriormente a un protocolo de extinción en el que los animales fueron sometidos a un estímulo neutro continuo, i.e. un tono de 3 minutos de duración. Este protocolo de condicionamiento y posterior extinción nos permitió testar a los animales durante un periodo lo suficientemente amplio como para analizar el efecto de tratamientos farmacológicos crónicos sobre los procesos de extinción (administración del fármaco antes de las sesiones de extinción el primero, el segundo y el tercer día después del condicionamiento). Para investigar la participación del SEC en el proceso de extinción de la respuesta de miedo, tratamos a los animales con diversos moduladores de este sistema. Nuestros resultados demuestran por vez primera que el aumento selectivo del 2-araquidonilglicerol (2-AG) promueve la expresión de respuestas de miedo pasivas a través de los receptores CB1 situados en neuronas GABAérgicas. Por este motivo, para el tratamiento de trastornos psiquiátricos tales como las fobias, el estrés post-traumático o la adicción a drogas no deberían emplearse potenciadores no selectivos de los niveles de endocannabinoides. Es más, nuestros datos demuestran un efecto “*yin-yang*” de los receptores CB1, que en neuronas GABAérgicas promueven el miedo, mientras que en las glutamatérgicas alivian esta emoción. Por último, encontramos que el uso del inhibidor de la recaptación de endocannabinoides AM404 parece evitar los efectos de un aumento de los niveles de endocannabinoides en neuronas GABAérgicas, mediante un mecanismo dependiente de los receptores CB1 y TRPV1.

Destacamos a continuación una serie de puntos que consideramos como contribuciones especialmente importantes de esta Tesis Doctoral

- El estrés durante etapas tempranas del desarrollo puede modular los efectos del consumo crónico durante la adolescencia de diversas drogas de abuso, como son el cannabis, la cocaína y el éxtasis
- La administración combinada de éxtasis y cannabis produce efectos negativos a largo plazo. Los modelos animales que mimetizan los patrones de consumo humanos de drogas de abuso aportan una información más exacta de sus efectos que los experimentos con administraciones agudas.

- El sexo, o el género, es un factor crítico que debe ser tenido en cuenta dado que, como muestran los resultados de esta Tesis Doctoral, la naturaleza y la intensidad de los efectos de los diversos tratamientos dependen claramente del sexo de los individuos.
- La exposición a drogas de abuso en la adolescencia causa efectos deletéreos sobre las células gliales. Este impacto a largo plazo sobre este tipo celular, cuya interacción con las neuronas es fundamental para la correcta homeostasis cerebral, nos ayuda a comprender lo devastador de los efectos de la adicción a drogas.
- No sólo la expresión del receptor CB1 puede verse afectada debido a un tratamiento farmacológico o de tipo ambiental, sino también su actividad. Por este motivo, es recomendable realizar la evaluación de la densidad y distribución del receptor así como de su funcionalidad para poder así ofrecer una visión más fehaciente de la naturaleza de los efectos de tales manipulaciones.
- El aumento de los niveles de 2-AG promueve la expresión de respuestas pasivas de miedo a través de los receptores CB1 presentes en neuronas GABAérgicas. En este contexto, posibles intervenciones farmacológicas conducentes al tratamiento de trastornos psiquiátricos tales como las fobias, el estrés post-traumático o la adicción a drogas deberían evitar el uso de potenciadores no selectivos de la señal endocannabinoide.

Lista de artículos originales que contienen los resultados descritos en la presente Tesis Doctoral:

Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, López-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, Nadal R (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16:624-37.

López-Gallardo M, López-Rodríguez AB, **Llorente-Berzal Á**, Rotllant D, Mackie K, Armario A, Nadal R, Viveros MP (2012). Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience* 204:90-103.

Llorente-Berzal A, Manzanedo C, Daza-Losada M, Valero M, López-Gallardo M, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Viveros MP (2013). Sex-dependent effects of early maternal deprivation on MDMA-induced conditioned place preference in adolescent rats: possible neurochemical correlates. *Toxicology* 311:78-86.

Llorente-Berzal A, Assis MA, Rubino T, Zamberletti E, Marco EM, Parolaro D, Ambrosio E, Viveros MP (2013). Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure. *Pharmacol Res* 74:23-33.

Llorente-Berzal A, Puighermanal E, Burokas A, Ozaita A, Maldonado R, Marco EM, Viveros MP (2013). Sex dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption. *Plos One*. En prensa.

López-Rodríguez AB, **Llorente-Berzal A**, Garcia-Segura L, Viveros M (2013). Sex dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. *Br J Pharmacol*. En prensa.

Llorente-Berzal A, Terzian ALB, Viveros MP, Wotjak CT (2013). Pharmacological enhancement of anandamide and 2-AG levels modifies the expression of conditioned fear in opposite directions. *Neuropsychopharmacology*. Enviado.

INTRODUCCIÓN

1. PERIODOS CRÍTICOS DEL DESARROLLO

Un periodo crítico del desarrollo es una ventana temporal en la que un organismo, y más particularmente su cerebro, están en pleno desarrollo, y durante la cual ciertas influencias ambientales o farmacológicas pueden, con una gran eficacia, provocar cambios neuroendocrinos y conductuales a largo plazo. Así, existen evidencias que indican que individuos que se han criado en un ambiente favorable muestran un correcto desarrollo social, emocional y cognitivo (Korosi *et al.*, 2012; Veenema, 2009). Sin embargo, la separación o el abandono por parte de los progenitores, el estrés social, la presencia de abusos físicos o sexuales, o el consumo abusivo de drogas en determinadas etapas de la vida se relacionan con la aparición de alteraciones del desarrollo de varios sistemas neurobiológicos y endocrinos, y pueden ser la causa de alteraciones estructurales y funcionales a largo plazo en el cerebro tanto en seres humanos (Fatemi y Folson, 2009; Garey, 2010; Pardo y Eberhart, 2007; Heim y Nemeroff, 2001) como en animales (Viveros *et al.*, 2009, 2012a; Marco *et al.*, 2009; Veenema, 2009; Moffett *et al.*, 2007). Estas alteraciones podrían producir, al final de la adolescencia o comienzo de la vida adulta, una sintomatología de tipo depresivo, respuestas alteradas de ansiedad, consumo y adicción a drogas de abuso, y/o problemas de cognición y aprendizaje (Meyer y Feldon, 2010; Viveros *et al.*, 2009; Moffett *et al.*, 2007). El hecho de que los síntomas se revelen durante la adolescencia podría deberse a que es durante este periodo cuando se alcanza la madurez funcional de la mayoría de estructuras cerebrales, y sería en ese momento cuando su funcionamiento se revelaría defectuoso (Brenhouse y Andersen, 2011).

Cuando se compararon niños que nunca habían sido institucionalizados con niños procedentes de orfanatos rumanos durante los años 80, caracterizados por poseer un desfavorable ratio cuidador-niño, rutinas altamente reglamentadas (i.e. los niños comían, dormían e iban al servicio al mismo tiempo), así como una estimulación sensorial, cognitiva y lingüística muy pobre, estos últimos exhibían una función neuronal alterada en áreas límbicas, como demostraron estudios de imagen por resonancia magnética (Chugani *et al.*, 2001), y una función cognitiva deteriorada (Nelson *et al.*, 2007). También se ha visto, que estos efectos deletéreos son reversibles cuando se les encuentra un ambiente familiar favorable, aunque tan solo cuando esta

reubicación ocurre antes de que cumplan los dos años de edad (Bos *et al.*, 2010), lo que hace plantearse la existencia de una ventana temporal crítica de la reversión de los efectos negativos.

Podría decirse que el desarrollo cerebral, y por tanto, las conductas que exhibirá un individuo cuando llegue a la etapa adulta se ven influenciadas por una triple interacción genes-ambiente-desarrollo. La expresión génica se ve afectada por el ambiente, principalmente durante periodos críticos del desarrollo. Eventos adversos en etapas tempranas de la vida pueden modular la expresión de moléculas involucradas en la plasticidad celular, lo que contribuye a alteraciones permanentes de la estructura y funcionalidad del cerebro, lo que podría conducir, en última instancia, a un aumento de la vulnerabilidad a sufrir enfermedades psiquiátricas, tales como la depresión o la esquizofrenia (Korosi *et al.*, 2012), lo que es conocido como hipótesis del neurodesarrollo de las enfermedades psiquiátricas.



Figura 1. El cerebro, y por tanto también, el comportamiento, no viene sólo determinado por la interacción genes-ambiente, sino más bien por una interacción cuádruple genes-ambiente-desarrollo-sexo. Los genes se ven afectados por el ambiente durante periodos críticos del desarrollo de manera sexo-dependiente. Esta programación del cerebro durante el desarrollo determina la vulnerabilidad a sufrir una psicopatología más adelante en la vida. Modificado de Korosi *et al.* (2012).

Además, dentro de la interacción genes-ambiente-desarrollo podría incluirse el sexo como otro importante factor de esta ecuación (Bale, 2009; Fig. 1). Diversas

observaciones clínicas revelan que la prevalencia y la sintomatología de diversas enfermedades neuropsiquiátricas cuyo origen viene determinado por un desarrollo anómalo difieren entre sexos (Korosi *et al.*, 2012; Viveros *et al.*, 2012b). Por ejemplo, la prevalencia de la depresión es el doble en mujeres que en hombres (Smith *et al.*, 2008; Blazer *et al.*, 1994), mientras que la esquizofrenia se da más a menudo y aparece antes en los hombres que en las mujeres (McGrath y Susser, 2009; Flor-Henry, 1985). Por tanto, comprender los mecanismos neurobiológicos subyacentes por los que aparece una vulnerabilidad específica del sexo adquiere una gran importancia a la hora de identificar nuevas dianas terapéuticas y preventivas.

1.1. El estrés perinatal y el modelo de separación materna temprana

Con el fin de poner a prueba la hipótesis del neurodesarrollo se han utilizado diversos modelos animales que incluyen tratamientos invasivos, que implican la asfixia perinatal o la hipoxia postnatal, simulando complicaciones obstétricas, o mediante lesiones realizadas en áreas cerebrales concretas en etapas tempranas del desarrollo (Lyon *et al.*, 2012), y otros que no conllevan la realización de lesiones sino más bien exposición a factores estresantes, que son de carácter “ambiental/social” y que interfieren con el desarrollo de los individuos, bien durante el periodo fetal [ver revisión de Meyer y Feldon (2010)], o durante el periodo neonatal temprano. En el contexto de esta Tesis Doctoral, nos interesaron manipulaciones del ambiente neonatal, modelos que a nuestro juicio tienen un carácter más holístico que la lesión de una región cerebral concreta y que, por tanto, pueden aproximarse más a la realidad de lo que ocurre en humanos. Las crías de los roedores están poco desarrolladas al nacer y requieren de un intensivo cuidado por parte de la madre para asegurar un control homeostático y un desarrollo sensorial y motor adecuado (Veenema, 2009). Por este motivo, se han empleado diversas manipulaciones que modulan las interacciones madre-cría y, que abarcan, desde separaciones de tiempo relativamente corto a lo largo de varios días postnatales hasta una sola separación de 24 horas en un día determinado del periodo neonatal, normalmente dentro de los primeros 15 días de vida postnatal (McClelland *et al.*, 2011; Cirulli *et al.*, 2009).

Entre los diversos modelos de separación materna (SM), en nuestro grupo de investigación hemos estudiado extensivamente el empleado por los grupos de trabajo de los Doctores De Kloet y Ellenbroek. Este modelo consiste en una única interrupción de la relación madre-camada durante un periodo prolongado (24 horas) durante el día postnatal (DP) 9 (Marco *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2009). Existen una gran variedad de estudios que demuestran que este protocolo de SM en concreto produce alteraciones neurológicas, conductuales, endocrinas, metabólicas e inmunológicas a corto y largo plazo (Tabla 1). Además, en muchos casos, estos efectos son dependientes del sexo, lo cual resalta la importancia del factor sexo en el estudio de las psicopatologías. A continuación se enumeran en la siguiente tabla las alteraciones descritas que causa el protocolo de SM utilizado en la presente Tesis Doctoral:

Tabla 1. Principales efectos de un único episodio de 24 horas de separación materna a día postnatal 9 sobre ratas *Wistar*

Alteraciones neurológicas	
Retardo en la apertura de los ojos	Ellenbroek <i>et al.</i> , 2005
Aumento de los niveles de ARNm para IGF-1 en el hipotálamo de machos a DP 13	Viveros <i>et al.</i> , 2010b
Aumento de la expresión de proteína apoptótica BAX en el hipotálamo de machos a DP 13	
Aumento del número de neuronas en degeneración en el hipocampo tanto en machos como en hembras a DP 13	Llorente <i>et al.</i> , 2009
Disminución de los niveles de NeuN en el hipocampo y el córtex frontal de animales adolescentes (DP 40) de ambos sexos	Marco <i>et al.</i> , 2013
Disminución de la expresión de NG2 (marcador de oligodendrocitos) en el hipocampo de animales de ambos sexos a DP 40	
Aumento, en animales macho, de los niveles de PCNA hipotalámica a DP 13	Viveros <i>et al.</i> , 2010b
Disminución de la expresión hipotalámica de nestina en hembras 12 horas después del protocolo de SM	Viveros <i>et al.</i> , 2010a
A corto plazo (DP 13) la SM produjo un aumento del número de células GFAP+ en el hipocampo de machos sin cambios en el de las hembras, y este efecto se mantuvo al menos hasta la adolescencia (DP 40)	Marco <i>et al.</i> , 2013; Llorente <i>et al.</i> , 2008

Aumento del número de células GFAP+ en el cerebelo de machos y disminución en el de hembras a corto plazo (DP 13)	Llorente <i>et al.</i> , 2009
Disminución de la expresión hipotalámica de GFAP en machos desde 12 horas después de la SM hasta el DP 13	Viveros <i>et al.</i> , 2010a, 2010b
Incremento de los niveles de ARNm hipotalámicos y disminución de la expresión proteica en hipocampo y córtex frontal de BDNF en animales adolescentes de ambos sexos. Asimismo, se observó en animales adultos una disminución de la expresión hipocampal de BDNF en ambos sexos	Marco <i>et al.</i> , 2013; Llorente <i>et al.</i> , 2011; Viveros <i>et al.</i> , 2010b; Roceri <i>et al.</i> , 2002
Disminución de los niveles hipocampales de NCAM en animales adolescentes de ambos sexos	
Disminución de los niveles de PSD95 (marcador de densidad postsináptica) en el hipocampo y córtex frontal de animales macho y hembra a DP 40	
Disminución de la expresión de sinaptofisina en el córtex frontal de animales adolescentes (DP 40) de ambos sexos	Llorente <i>et al.</i> , 2011; Marco <i>et al.</i> , 2013
En animales adolescentes (DP 40) no se encontró ningún efecto de la SM sobre los niveles hipocampales de sinaptofisina ni en machos ni en hembras, sin embargo, se observó una disminución de su expresión en el hipocampo de machos adultos (DP 90) sin cambios en las hembras	
Aumento de los niveles de 2-AG hipocampales en animales macho a DP 13	Llorente <i>et al.</i> , 2008
Disminución de la expresión de receptor CB1 en el hipocampo de animales de ambos sexos a corto y medio plazo (DP 13 y 40)	
Disminución de la expresión del receptor CB1 en el córtex frontal de animales adolescentes de ambos sexos	
Aumento de los niveles de receptor CB2 en el hipocampo de animales macho y hembra a DP 13 y tendencia a la continuación de tal efecto en animales de ambos sexos a DP 40	Marco <i>et al.</i> , 2013; Llorente <i>et al.</i> , 2009; Suárez <i>et al.</i> , 2009
Aumento de la expresión de receptor CB2 en el córtex prefrontal de animales adolescentes (DP 40) de ambos sexos	

Aumento de expresión de la enzima DAGL- α en el hipocampo de machos y de hembras a DP 13	
Disminución de la expresión génica en machos y de los niveles de proteína en ambos sexos de la MAGL hipocampal en animales de 13 días de edad	Suárez <i>et al.</i> , 2010
Menor respuesta al efecto en agudo de anfetamina en animales macho sin destetar	Ellenbroek <i>et al.</i> , 2005
Mayor susceptibilidad a los efectos de la apomorfina y la d-anfetamina en animales macho adultos	Rentesi <i>et al.</i> , 2013; Ellenbroek y Cools, 2000
Incremento de los niveles de dopamina en el córtex prefrontal y en el estriado de animales de ambos sexos a DP 35	Llorente <i>et al.</i> , 2010
Disminución de la densidad de receptores D ₁ y aumento de los receptores D ₂ en el córtex prefrontal de machos	
Aumento de la densidad de receptores D ₁ y disminución de los receptores D ₂ en el núcleo accumbens de hembras adultas (DP 82)	Zamberletti <i>et al.</i> , 2012a
Aumento de los niveles de dopamina y de su receptor D ₂ en el estriado y disminución de este mismo receptor en el córtex prefrontal de animales macho adultos	
Expresión de DARPP-32 disminuída en el córtex prefrontal y aumentada en el estriado de animales macho adultos. Aumento de su fosforilación en la zona de unión Thr34 en el estriado y la amígdala y una disminución de su fosforilación en el córtex prefrontal	Rentesi <i>et al.</i> , 2013
Incremento de los niveles de serotonina en córtex prefrontal, hipocampo, estriado y mesencéfalo de animales de ambos sexos a DP 35	Llorente <i>et al.</i> , 2010
Disminución en animales macho adultos de los niveles de serotonina en el córtex prefrontal y la amígdala, así como una disminución de la expresión del receptor 5-HT _{2A} en estriado y córtex prefrontal, sin un aumento de su densidad en amígdala	Rentesi <i>et al.</i> , 2013
Reducción de la expresión hipocampal de las subunidades NR-2A y 2B del receptor NMDA en animales macho adultos	Roceri <i>et al.</i> , 2002
Aumento de la densidad de receptores para NMDA en el caudado putamen de hembras adultas (DP 82)	Zamberletti <i>et al.</i> , 2012a
Reducción de los niveles de NPY y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el hipocampo y la corteza occipital	Husum <i>et al.</i> , 2002

Disminución de la expresión génica de los receptores hipocámpales para glucocorticoides en machos adultos	Llorente <i>et al.</i> , 2011
Reducción de los niveles de glutamato y glutamina en el hipocampo y córtex prefrontal de machos y hembras a DP 13	
Aumento de los niveles de AAT en el hipocampo y córtex prefrontal de animales de ambos sexos con 13 días de edad	Llorente <i>et al.</i> , 2012
Disminución de los niveles de NAA en el córtex prefrontal de machos y hembras con 13 días de edad	
Aumento de los niveles de PEA en el hipocampo de animales de ambos sexos a DP 13	
Aumento de los niveles de colina en el hipocampo de machos a DP 13	
Alteraciones conductuales	
Reducción de la actividad locomotora y la frecuencia de postura erguida en animales macho tras el protocolo de SM hasta la adolescencia. En animales macho adultos, sin embargo, se observa un aumento de la actividad locomotora tanto vertical como horizontal	Rentesi <i>et al.</i> , 2013; Llorente <i>et al.</i> , 2007; Ellenbroek <i>et al.</i> , 2005
Incremento de la emotividad de machos adultos sometidos al campo abierto	Rentesi <i>et al.</i> , 2010
Aumento en los niveles de impulsividad en animales adolescentes macho	Marco <i>et al.</i> , 2007
Conducta de tipo depresivo en machos adolescentes (DP 35) sometidos al test de la natación forzada. En animales adultos se observa el mismo efecto pero en ambos sexos	Zamberletti <i>et al.</i> , 2012a; Llorente <i>et al.</i> , 2007
Aumento de las conductas agresivas en hembras adultas sometidas al test de interacción social	Zamberletti <i>et al.</i> , 2012a
Déficit cognitivo en la memoria de trabajo medida mediante NOT en hembras adolescentes (DP 40)	Marco <i>et al.</i> , 2013
Alteración en la respuesta de inhibición latente en animales macho adultos	Ellenbroek y Cools, 1995
Déficit en la respuesta de la PPI y de la amplitud de respuesta de sobresalto en machos adultos	Husum <i>et al.</i> , 2002; Ellenbroek y Cools, 2000; Ellenbroek <i>et al.</i> , 1998

Alteraciones endocrinas y metabólicas	
Incremento de los niveles de corticosterona y ACTH circulantes en animales de ambos sexos a DP 13. En animales adultos sólo se ha observado tal aumento en machos	Rentesi <i>et al.</i> , 2010; Viveros <i>et al.</i> , 2009, 2010a; Llorente <i>et al.</i> , 2008
Mayor aumento en los niveles de ACTH en respuesta a un estímulo estresante	Suchecki <i>et al.</i> , 1993
Disminución de los niveles plasmáticos de testosterona y estrógenos en machos adultos	Llorente <i>et al.</i> , 2011; Viveros <i>et al.</i> , 2010b
Disminución de los niveles de leptina en animales de ambos sexos desde DP 13 hasta la edad adulta (DP 102)	Mela <i>et al.</i> , 2012a; Llorente <i>et al.</i> , 2011; Viveros <i>et al.</i> , 2009, 2010a; 2010b
Disminución de los niveles de insulina en plasma en animales macho a DP 45 y 85	Mela <i>et al.</i> , 2012a
Disminución de los niveles de adiponectina en hembras a DP 75	Viveros <i>et al.</i> , 2010b
Reducción del peso corporal en ambos sexos desde el DP 10 y durante la adolescencia. En machos se ha descrito que tal reducción continúa al menos hasta el DP 68	Marco <i>et al.</i> , 2013; Rentesi <i>et al.</i> , 2010; Viveros <i>et al.</i> , 2010b; Llorente <i>et al.</i> , 2007, 2011; Ellenbroek <i>et al.</i> , 2005
Disminución de la ingesta de calorías desde el destete hasta la adolescencia (DP≈45) en animales de ambos sexos	Mela <i>et al.</i> , 2012a
Disminución de la glucemia en ambos sexos pocas horas después del protocolo de SM. A DP 35, sólo se observa esta disminución en las hembras	Mela <i>et al.</i> , 2012a; Viveros <i>et al.</i> , 2010a
Disminución de los niveles de triglicéridos en hembras a DP 35	Mela <i>et al.</i> , 2012a
Disminución del ARNm para el PPAR- α en tejido adiposo de machos adolescentes (DP 35)	Viveros <i>et al.</i> , 2010b

Alteraciones inmunológicas

Disminución del número de células NK en el timo de animales de ambos sexos durante toda la vida del animal

A lo largo de la vida del animal se observaron, tanto en machos como en hembras, unos menores niveles de linfoproliferación mediada por mitógeno y del índice de quimiotaxis en timo y bazo. El mismo efecto se observó en los ganglios axilares de animales adolescentes

De la Fuente *et al.*,
2009; Llorente *et al.*,
2007

Abreviaturas empleadas: 2-AG, 2-araquidonil glicerol; ACTH, hormona adrenocorticotropa; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; DAGL- α , diacilglicerol lipasa alfa; DARPP-32, fosfoproteína neuronal regulada por c-AMP y dopamina de peso molecular 32 kDa; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1; MAGL, monoacilglicerol lipasa; NAA, N-acetil aspartato; NCAM, molécula de adhesión celular neural; NK, *natural killer*; NOT, test de reconocimiento de objetos; NPY, neuropéptido Y; PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación; PPAR- α , receptor activador de la proliferación de los peroxisomas alfa; PPI, inhibición prepulso

Una de las características del protocolo de SM de 24 horas a DP 9 es que se realiza durante el denominado periodo de hiporreactividad al estrés (SHRP, del inglés *stress hyporesponsive period*). El SHRP, que aparece durante las dos primeras semanas de vida postnatal, es un periodo del neurodesarrollo en el que el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) exhibe una baja actividad debido a que existe una sensibilidad reducida de la glándula adrenal a la ACTH y en consecuencia los niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH son extremadamente bajos. El SHRP es considerado como una fase altamente adaptativa del desarrollo debido a que para un adecuado desarrollo del sistema nervioso central es necesario el mantenimiento de unos niveles bajos y estables de glucocorticoides (Faturi *et al.*, 2010). Por ello, los efectos que han sido descritos tras someter a los animales a este protocolo de estrés neonatal podrían deberse principalmente a la acción perjudicial del aumento de glucocorticoides en respuesta al estrés de la SM durante la SHRP sobre el cerebro en desarrollo, particularmente sobre zonas especialmente sensibles como por ejemplo el hipocampo, que tiene una alta densidad de receptores de glucocorticoides (Sapolsky *et al.*, 1988; Gould, 1994).

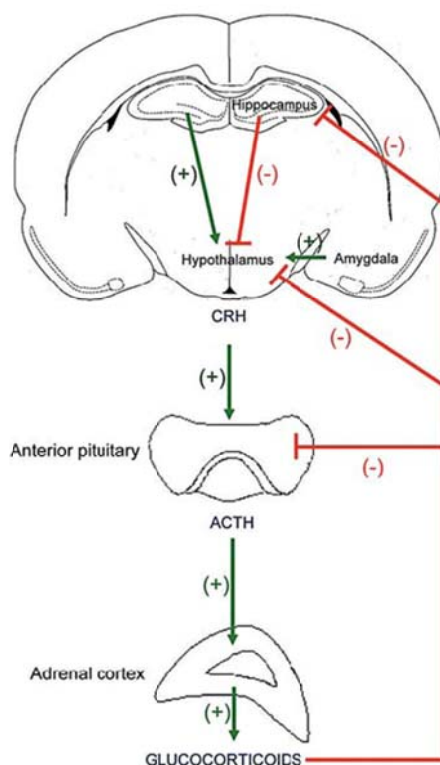


Figura 2. Esquema de la secuencia de estructuras y moléculas activadas durante el estrés. Las señales de estrés producen la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, del inglés *corticotropin releasing hormone*) en el hipocampo y el hipotálamo. La activación de los receptores para CRH en la hipófisis como resultado de la liberación de CRH del hipotálamo inicia la respuesta periférica al estrés, incluyendo la secreción de ACTH y corticosterona. Los glucocorticoides atraviesan la barrera hematoencefálica y actúan sobre los receptores de una gran variedad de regiones cerebrales, incluyendo el hipocampo. Niveles anormalmente altos de glucocorticoides en el hipocampo producen efectos deletéreos sobre el desarrollo y el funcionamiento de las células del hipocampo. Modificado de Sandi y Bisaz, (2007).

Otra región cerebral, aparte del hipocampo, cuyo neurodesarrollo se ha visto que se encuentra alterado por el protocolo de SM es el hipotálamo (Viveros *et al.*, 2009, 2010a, 2010b). Esta alteración podría deberse, al menos en parte, a los efectos deletéreos del aumento de los niveles de glucocorticoides producido por el estrés de la SM. Sin embargo, la leptina, cuya implicación en el desarrollo del hipotálamo ha sido descrita recientemente (Bouret y Simerly, 2007), podría también estar implicada en tales efectos. De hecho, una de las alteraciones de la SM que más ha llamado la atención en nuestro grupo de investigación es la disminución persistente de los niveles circulantes de leptina que puede observarse tanto durante el propio período de SM como en la edad adulta (Mela *et al.*, 2012a; Llorente *et al.*, 2011; Viveros *et al.*, 2009, 2010a; 2010b).

Esta alteración de los niveles plasmáticos de leptina, así como diversos cambios de carácter metabólico, incluyendo una ganancia de peso corporal reducida, que también han sido observados a largo plazo por nuestro grupo (ver Tabla 1), podrían deberse a una disrupción del pico fisiológico de leptina, que en roedores comienza a DP 5 y alcanza su máximo entre los DP 9 y 10 (coincidiendo precisamente con el momento en el cual se lleva a cabo el protocolo de SM), dado que esta elevación de los niveles de leptina parece ser crítica para un correcto desarrollo del circuitaje hipotalámico implicado en la regulación del balance energético en etapas posteriores de la vida (Mela *et al.*, 2012b; Cottrell *et al.*, 2009; Attig *et al.*, 2008; Delahaye *et al.*, 2008; Yura *et al.*, 2005; Ahima *et al.*, 1998).

Otro componente del sistema nervioso central que podría estar involucrado en los efectos deletéreos de la SM es el sistema endocannabinoide (SEC). Entre las múltiples funciones del SEC, existen evidencias de su papel en diversas fases del desarrollo cerebral, incluyendo el crecimiento axonal, la fasciculación y el establecimiento de una correcta conectividad (Gaffuri *et al.*, 2012; Keimpema *et al.*, 2011; Galve-Roperh *et al.*, 2006, 2009; Harkany *et al.*, 2007, 2008; Watson *et al.*, 2008; Viveros *et al.*, 2005a; Fernandez-Ruiz *et al.*, 2004). Uno de los efectos a corto plazo que han sido descritos en animales SM son cambios en diversos componentes del SEC, tales como una disminución de la expresión hipocampal de receptores CB1 y un aumento de los niveles de 2-AG, así como alteraciones en la expresión de las enzimas encargadas de su biosíntesis y su degradación en el hipocampo de animales macho a DP 13 (Suárez *et al.*, 2009; 2010). Por todo ello, algunos de los efectos producidos por el protocolo de SM y observados a largo plazo podrían estar relacionados con alteraciones del neurodesarrollo en el que el SEC juega un papel prominente. En este sentido, las conductas relacionadas con el consumo adictivo de drogas de abuso, en las que, como ya discutiremos en el siguiente apartado, el SEC está altamente implicado (Serrano y Parsons, 2011), podrían verse modificadas por nuestro protocolo de SM.

A este respecto, y como ya hemos señalado anteriormente, existen numerosas evidencias que demuestran que, en los seres humanos, experiencias adversas tempranas en la vida pueden aumentar el riesgo a desarrollar abuso de drogas, más adelante en la vida (Enoch, 2012; Neisewander *et al.*, 2012; Viveros *et al.*, 2012a; Spak *et al.*, 1998). En este sentido, mediante la utilización de diferentes modelos de SM se ha podido

observar cómo un estrés durante etapas tempranas del desarrollo causa diversas alteraciones sobre los efectos que producen las drogas de abuso. Estos efectos incluyen alteraciones en la auto-administración de cocaína (Flagel *et al.*, 2003; Matthews *et al.*, 1999), sensibilización inducida por cocaína (Li *et al.*, 2003), condicionamiento de preferencia de lugar por anfetamina (Campbell y Spear, 1999) y respuestas a morfina (Kalinichev *et al.*, 2001, 2002, 2003). Sin embargo, en el momento de redactar esta Memoria, sólo existe un trabajo que haya estudiado los efectos a largo plazo de la combinación del protocolo de SM empleado en la presente Tesis Doctoral con un tratamiento crónico con una droga de abuso durante la adolescencia, y este ha sido publicado muy recientemente (Zamberletti *et al.*, 2012a).

1.2. La adolescencia como periodo de vulnerabilidad

La adolescencia es el periodo de transición entre la infancia y la edad adulta durante el cual se producen dramáticos cambios fisiológicos y psicológicos. El adolescente experimenta no sólo los cambios relacionados con el crecimiento físico, sino también aquéllos relacionados con la maduración a nivel emocional, psicológico y social.

Según la organización mundial de la salud, la adolescencia, en los seres humanos, se da entre los 11 y 19 años de edad, dependiendo del sexo, comenzando y terminando antes en las niñas que en los niños. Este periodo de transición entre la niñez y la etapa adulta se encuentra altamente conservado a lo largo de la filogenia de los mamíferos y se ha visto que tanto primates no humanos, como roedores muestran un repertorio de conductas, unos cambios hormonales y unas transformaciones cerebrales muy similares a la de los adolescentes humanos (Viveros *et al.*, 2012a; Doremus-Fitzwater *et al.*, 2010; Spear, 2000). En roedores, se considera que la adolescencia se extiende a lo largo del periodo comprendido entre los DPs 28 y 42 (Schneider, 2013; Viveros *et al.*, 2011; Adriani y Laviola, 2004; Spear, 2000).

En general, durante este periodo, los individuos exhiben una gran variedad de conductas características de esta etapa y que les diferencian de sus homólogos adultos, como son, un incremento de la conducta social y de la búsqueda de novedad y de nuevas sensaciones, una tendencia a la conducta de toma de riesgos, así como una

inestabilidad emocional y una elevada impulsividad (Viveros *et al.*, 2012a; Sturman y Moghaddam, 2011; Doremus-Fitzwater *et al.*, 2010). Estas conductas, “típicas” de la adolescencia, tienen su base en los cambios radicales que se producen en el cerebro de los adolescentes, que implican un alto grado de remodelación estructural plástica y alteraciones funcionales (Paus, 2005; Gogtay *et al.*, 2004). Durante este periodo se encuentran en pleno desarrollo áreas involucradas en la toma de decisiones, incluyendo el córtex prefrontal, áreas cognitivas y de razonamiento, y vías de conexión con el sistema límbico importantes en el control de los impulsos y las emociones (Viveros *et al.*, 2011; 2012a; McCormick *et al.*, 2010; Tau y Peterson, 2010).

Uno de los aspectos más relevantes del desarrollo cerebral durante la adolescencia es el proceso de refinamiento de las sinapsis. Cuando se acerca la adolescencia se produce una sobreproducción de sinapsis y, más adelante en el desarrollo, se produce una pérdida de neuronas conocida como “*prunning*” o “poda sináptica” (Brenhouse y Andersen, 2011). Este fenómeno de sobreproducción de sinapsis está relacionado con la sobreexpresión de receptores del sistema dopaminérgico, serotoninérgico, norepinefrinérgico, glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico y endocannabinoide que se observa durante esta etapa (Eggan *et al.*, 2010; Andersen *et al.*, 2000; Lidow *et al.*, 1991), mientras que la pérdida de sinapsis se asocia, en parte, con la disminución de la sustancia gris y el aumento de la sustancia blanca característica de la adolescencia (Gogtay *et al.*, 2004). Asimismo, a lo largo del desarrollo, se produce una ganancia del volumen cerebral relacionada con los procesos de mielinización de los haces de fibras nerviosas (Brenhouse y Andersen, 2011). Se ha observado que, tanto el refinamiento de las sinapsis como los procesos de mielinización tienen ventanas temporales distintas según la región cerebral, pero también se han observado diferencias según el sexo (Fig. 3) (Brenhouse y Andersen, 2011; Viveros *et al.*, 2011). Con respecto a éstas últimas, se ha descrito cómo las hormonas gonadales juegan un papel importante en la regulación de las modificaciones neuronales durante la adolescencia (Viveros *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha visto que las hormonas testiculares son responsables del aumento de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas del hipocampo de ratones macho, así como de su disminución tras la pubertad, ya que se ha observado una ausencia de tales efectos en ratones que fueron castrados antes de alcanzar la madurez sexual (Meyer *et al.*, 1978).

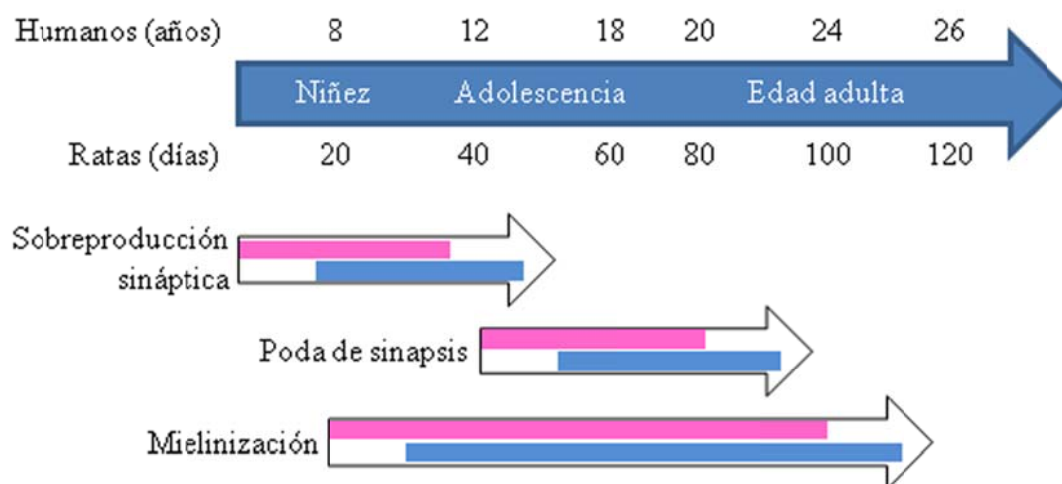


Figura 3. Línea temporal de los procesos del desarrollo en seres humanos y ratas. Las barras rosas representan la línea temporal de las hembras, la cual precede a la de los machos, representada como barras azules. Modificada de Brenhouse y Andersen, 2011.

En la actualidad se piensa que uno de los sistemas más crucialmente implicados en el correcto desarrollo de todos los procesos neurológicos por los que pasa el cerebro adolescente es el SEC (Schneider, 2013). De hecho, como ya se ha mencionado antes, es bien conocido el papel del SEC en el desarrollo cerebral (Gaffuri *et al.*, 2012; Keimpema *et al.*, 2011; Galve-Roperh *et al.*, 2006, 2009; Harkany *et al.*, 2007, 2008; Watson *et al.*, 2008; Viveros *et al.*, 2005a; Fernandez-Ruiz *et al.*, 2004), y durante la adolescencia han sido descritas alteraciones en la expresión de los diversos componentes del SEC, como por ejemplo el aumento progresivo y sexo-dependiente de la expresión de los receptores CB1 en el sistema límbico, el estriado y el mesencéfalo, alcanzando los niveles más elevados en las hembras a DP 30 y en los machos a DP 40, para luego ir disminuyendo hasta alcanzar los valores observados en los animales adultos (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993), o el aumento de los niveles hipotalámicos de anandamida en ratas hembra justo antes de alcanzar la pubertad (Wenger *et al.*, 2002). Asimismo, se ha observado que los agonistas cannabinoides producen efectos farmacológicos más potentes en adolescentes que en animales adultos (Schneider *et al.*, 2008) y se ha señalado una relación entre un consumo crónico de cannabis durante la adolescencia y la aparición de enfermedades neuropsiquiátricas (i.e. la esquizofrenia)

durante la vida del individuo [ver revisiones de Fernández-Espejo *et al.* (2009) y Zamberletti *et al.* (2012b)].

Durante la adolescencia el cerebro muestra una plasticidad “única” y parece existir una “ventana de vulnerabilidad” en lo referente al comienzo de diversas patologías neuropsiquiátricas (Viveros *et al.*, 2012a). Así, durante esta etapa aparecen los síntomas de una gran variedad de enfermedades mentales, tales como alteraciones del estado de ánimo, trastornos alimenticios, esquizofrenia y trastorno bipolar (Schneider, 2013; Viveros *et al.*, 2012a; Sturman y Moghaddam, 2011; Fernández-Espejo *et al.*, 2009; Adriani y Laviola, 2004). Como ya se ha mencionado al hablar de la teoría del neurodesarrollo, el hecho de que diversos síntomas psiquiátricos se manifiesten durante la adolescencia o durante la edad adulta temprana podría deberse a que es durante este periodo cuando se alcanza la madurez funcional de la mayoría de estructuras cerebrales, y sería en ese momento cuando su funcionamiento se revelaría defectuoso (Brenhouse y Andersen, 2011).

En el contexto de esta Tesis Doctoral nos ha interesado además el hecho de que es durante la adolescencia cuando se produce, normalmente, el inicio del consumo de drogas (Hittner y Swickert, 2006; Kelly *et al.*, 2006). Este hecho parece guardar relación con las conductas de riesgo (EMCDDA, 2012) debido a la motivación que presentan los adolescentes a experimentar nuevos e intensos estímulos para obtener una recompensa potencial (Doremus-Fitzwater *et al.*, 2010) así como para obtenerla lo antes posible sin una evaluación correcta de las consecuencias. Además, a través del estudio mediante modelos con roedores, se ha visto que los efectos que tienen las drogas de abuso sobre los adolescentes son diferentes, al menos en parte, a los que se observan en adultos. Por ejemplo, hay datos que indican que los animales adolescentes son más vulnerables a las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, y sufren menos los efectos aversivos de su abstinencia (Doremus-Fitzwater *et al.*, 2010; Nixon y McClain, 2010; Schramm-Sapota *et al.*, 2009; Adriani y Laviola, 2004), lo que facilita su consumo continuado y, por tanto, el desarrollo de la adicción a la droga. Dado que el cerebro adolescente, inmaduro, es especialmente vulnerable a los efectos deletéreos de las drogas, los modelos animales de adolescencia son particularmente relevantes para el análisis de esos efectos y de sus consecuencias a largo plazo, y este ha sido uno de los objetivos de nuestro trabajo.

2. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El estudio del sistema endocannabinoide (SEC) se emprendió tras la identificación y la síntesis del principal compuesto psicoactivo de la planta de marihuana o cannabis, *Cannabis sativa*, en la década de los 60, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964). A partir de ahí comenzó la caracterización de los componentes de este sistema de neurotransmisión, así como una creciente comprensión de su papel fisiológico.

2.1. Componentes del sistema endocannabinoide

2.1.1. Ligandos endocannabinoides

Los endocannabinoides son mediadores lipídicos que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadena poliinsaturada (Battista *et al.*, 2012). Actualmente, los endocannabinoides más estudiados y mejor conocidos son la anandamida (araquidonoiletanolamida, AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), aunque la familia de los endocannabinoides incluye también a la virodamina, al éter noladín y a la N-araquidonoil-dopamina (NADA), además de otros compuestos emparentados como son la palmitoiletanolamida (PEA) y la oleiletanolamida (OEA) (Fig. 4; Battista *et al.*, 2012; Di Marzo *et al.*, 2004; Piomelli, 2003).

La síntesis de estos compuestos cannabinoides endógenos es un proceso dependiente de calcio y se produce según demanda, es decir, en el momento en el que son necesarios, ya que dada su naturaleza lipofílica, y en contra de lo descrito para los neurotransmisores “clásicos”, no pueden ser almacenados en vesículas (Howlett *et al.*, 2004; Freund *et al.*, 2003; Mechoulam y Lichtman, 2003). Son sintetizados a partir de precursores de membrana y, a pesar de que la síntesis de AEA pueda llevarse a cabo a través de diversas rutas metabólicas (Muccioli, 2010), se considera a la fosfolipasa D dependiente de la N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD, del inglés *N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D*) la enzima mejor estudiada encargada de la producción de AEA (Okamoto *et al.*, 2009); mientras que la actividad enzimática de una fosfolipasa C seguida de la actividad de la diacilglicerol lipasa

(DAGL) es responsable de la síntesis de 2-AG (Ueda *et al.*, 2011). Tras su actuación, los endocannabinoides son introducidos al interior celular, proceso que podría estar facilitado por un transportador de membrana aún no caracterizado (Battista *et al.*, 2012; Moreira y Wotjak, 2010; Piomelli, 2003); aunque recientemente se ha observado que una amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*) inactiva podría mediar en el proceso de internalización de (Fu *et al.*, 2011). Tras la recaptura, se finaliza la actividad biológica de los endocannabinoides a través de una FAAH para la AEA (McKinney y Cravatt, 2005) y/o una monoacilglicerol lipasa (MAGL) para el 2-AG (Dinh *et al.*, 2002). Los productos de degradación resultantes son el ácido araquidónico y la etanolamina en el caso de la AEA y el ácido araquidónico y el glicerol en el caso de la degradación del 2-AG (Vandevorde, 2008; Howlett *et al.*, 2004; Freund *et al.*, 2003).

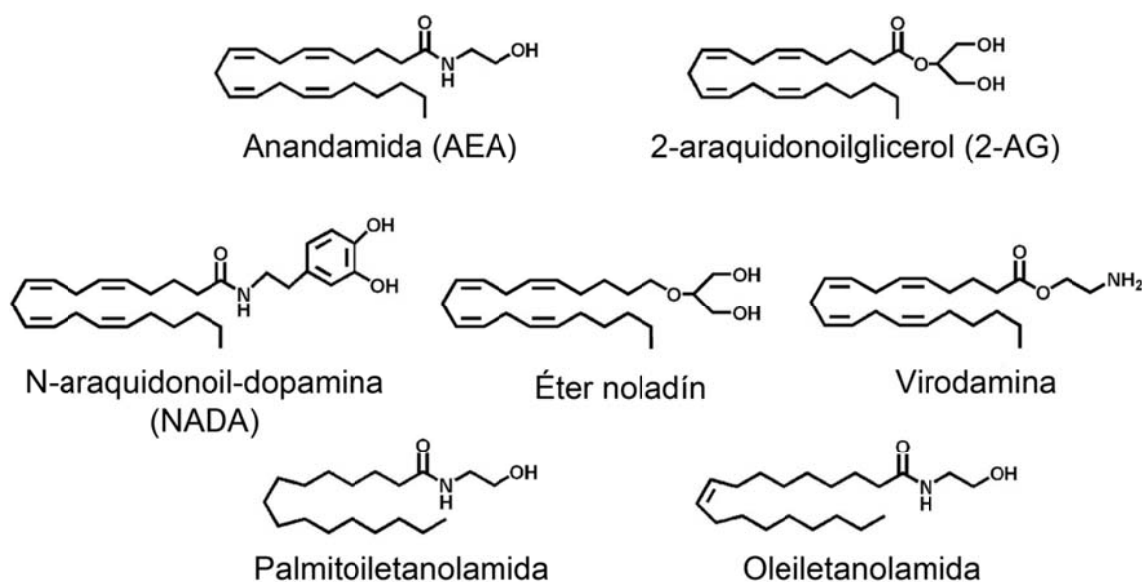


Figura 4. Estructura química de los endocannabinoides biológicamente activos y de sus compuestos afines. Modificada de Battista *et al.*, 2012.

Además de los endocannabinoides y de los fitocannabinoides (agonistas cannabinoides procedentes de la planta *Cannabis sativa*), se dispone en la actualidad de diversos agonistas cannabinoides sintéticos tales como el HU-210, el WIN 55,212-2 o el CP-55,940 (CP), éste último empleado en varios experimentos de la presente Tesis Doctoral, y, gracias al descubrimiento de la maquinaria de síntesis y degradación de los endocannabinoides, se ha abierto el camino al conocimiento de nuevas herramientas

farmacológicas encaminadas a la potenciación del tono cannabinoide endógeno, en particular, inhibidores de la inactivación de endocannabinoides, como por ejemplo el URB597 o el JZL184 que inhiben a la FAAH y a la MAGL respectivamente. Estos fármacos resultan de gran interés y, frente a los agonistas cannabinoides directos, parecen presentar una menor incidencia de efectos adversos en el estudio de su posible uso terapéutico (Marco y Viveros, 2009).

2.1.2. Los receptores cannabinoides

Los primeros datos que señalan la existencia de receptores cannabinoides fueron publicados por Howlett *et al.* (1986) al demostrar que los cannabinoides inhiben la acción de la enzima adenilato ciclasa. Poco después, el mismo grupo descubrió que el agonista cannabinoide CP presentaba sitios de unión en el cerebro (Devane *et al.*, 1988). La distribución de este receptor era consecuente con las propiedades farmacológicas de los cannabinoides (Herkenham *et al.*, 1990), y el receptor fue clonado ese mismo año (Matsuda *et al.*, 1990). Unos pocos años más tarde, un segundo receptor cannabinoide, CB2, fue clonado, pero esta vez en tejido periférico (Munro *et al.*, 1993).

Ambos, CB1 y CB2, son receptores metabotrópicos de siete segmentos transmembrana, acoplados a proteínas $G_{i/o}$ pero con propiedades farmacológicas y patrones de distribución diferentes. Así, las mayores densidades de receptor CB1 en el cerebro de los roedores adultos se hallan en el ganglio basal, la sustancia negra, el globo pálido, el cerebelo y el hipocampo (Mechoulam y Parker, 2013) mientras que el receptor CB2 está presente en células del sistema inmune mayoritariamente, aunque se ha visto que también se expresa en el sistema nervioso central (Onaivi *et al.*, 2008; Ashton *et al.*, 2006; van Sickle *et al.*, 2005), particularmente en células de microglía (Núñez *et al.*, 2004; Stella, 2004), aunque a niveles más bajos que los receptores CB1.

Los endocannabinoides actúan a través de los receptores CB1 y CB2, pero, además, recientemente ha sido descubierta la habilidad de algunos ligandos, tanto cannabinoides como no cannabinoides, de unirse también al receptor GPR55 (Lauckner *et al.*, 2008; Pertwee, 2007; Ryberg *et al.*, 2007). Además, el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1, del inglés, *transient receptor potential vanilloid 1*), normalmente activado por capsaicina y por una serie de estímulos físicos y químicos exógenos y endógenos, incluyendo temperaturas mayores a 43 °C y/o pH bajo, es una

diana alternativa para la AEA, aunque no para el 2-AG (Di Marzo y Petrocellis, 2010), y más recientemente, los receptores activadores de la proliferación de los peroxisomas (PPAR, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptors*) han sido agregados a la lista de dianas de los endocannabinoides, pudiendo ser activados tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Pistis y Melis, 2010).

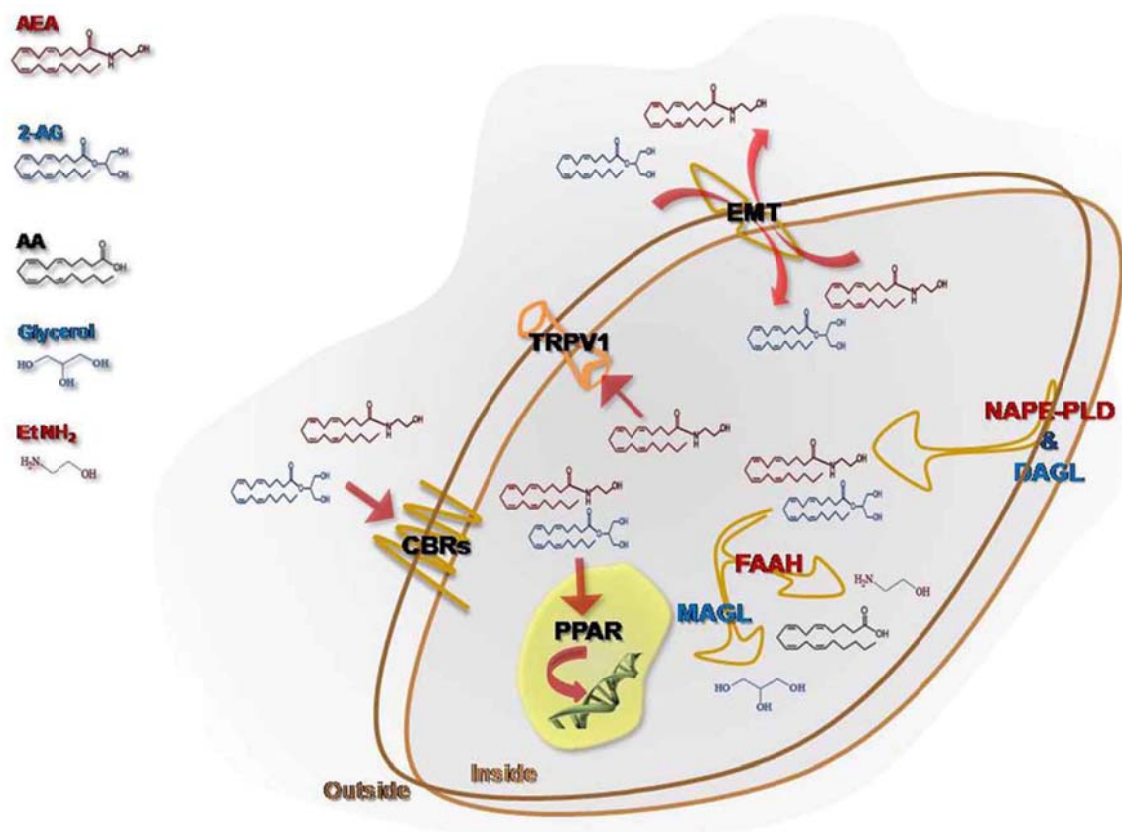


Figura 5. Representación esquemática de los principales elementos que constituyen el sistema endocannabinoide. La síntesis de anandamida (AEA) se debe a la acción de la fosfolipasa D dependiente de la N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), mientras que la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) es responsable de su degradación intracelular a etanolamina (EtNH₂) y ácido araquidónico (AA). El 2-araquidonoilglicerol (2-AG) es sintetizado a partir de lípidos de membrana a través de la actividad de la diacilglicerol lipasa (DAGL), y es hidrolizado mediante una monoacilglicerol lipasa (MAGL) citosólica que libera glicerol y AA. Un transportador de membrana aún no caracterizado (EMT) se encargaría de la internalización tanto de AEA como de 2-AG desde el espacio extracelular. Tanto la AEA como el 2-AG provocan la activación de diversas cascadas de transducción a través de sus moléculas diana, i.e. receptor CB1, receptor CB2, GPR55 y el receptor nuclear PPAR. La anandamida, pero no el 2-AG, también se une, intracelularmente al TRPV1. Tomada de Battista *et al.*, 2012.

2.2. Principales funciones del sistema endocannabinoide

La mayor parte de los efectos conductuales de los agonistas cannabinoides se relacionan con las acciones que éstos ejercen sobre el SNC. El principal papel de los endocannabinoides es el de actuar como moduladores de la transmisión sináptica, regulando diversos procesos fisiológicos fundamentalmente a través de los receptores CB1, en el seno de una gran variedad de redes neuronales locales. La presencia de receptores CB1 ha sido descrita en neuronas GABAérgicas, adrenérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas entre otras (Svizenska *et al.*, 2008; Marsicano y Lutz, 2006; Monory *et al.*, 2006; Nyiry *et al.*, 2005; Kathmann *et al.*, 1999). Los receptores CB1 se localizan presinápticamente y su activación provoca la inhibición de la adenilato ciclasa así como la activación de los canales de potasio y la inhibición de los canales calcio, tanto del tipo N como del tipo P/Q. Estas acciones producen una reducción de la excitabilidad de la neurona presináptica lo que causa, en última instancia, una inhibición de la liberación de neurotransmisores (Fig. 6). (Riebe y Wotjak, 2011).

Entre las diversas funciones en las que ha sido implicado el SEC se incluyen su papel en la coordinación y el control del movimiento, en los procesos de aprendizaje y memoria, en la regulación de estados emocionales y de ansiedad, en las respuestas al estrés y al dolor y en los mecanismos de control de la ingesta y el apetito, más en general, en la regulación del balance energético [ver revisiones de Mechoulam y Parker (2013), Giuffrida y Seillier (2012), Marco *et al.* (2012), Riebe y Wotjak (2011), Bermúdez-Silva *et al.* (2010), Hill y McEwen (2010), Moreira y Wotjak (2010), Marco y Viveros (2009), Moreira y Lutz (2008), Viveros *et al.* (2005b); Cravatt y Lichtman (2004) y Sullivan (2000)].

Además de todas estas funciones fisiológicas, y como ya hemos descrito en el primer apartado de la Introducción de esta Tesis Doctoral, el SEC juega un papel prominente en los procesos de neurodesarrollo. En el siguiente epígrafe, y debido a su importancia en el contexto de la presente Tesis Doctoral, nos centraremos en otras dos implicaciones funcionales del SEC, a saber, la adicción a drogas y la modulación de la extinción de memorias adversas.

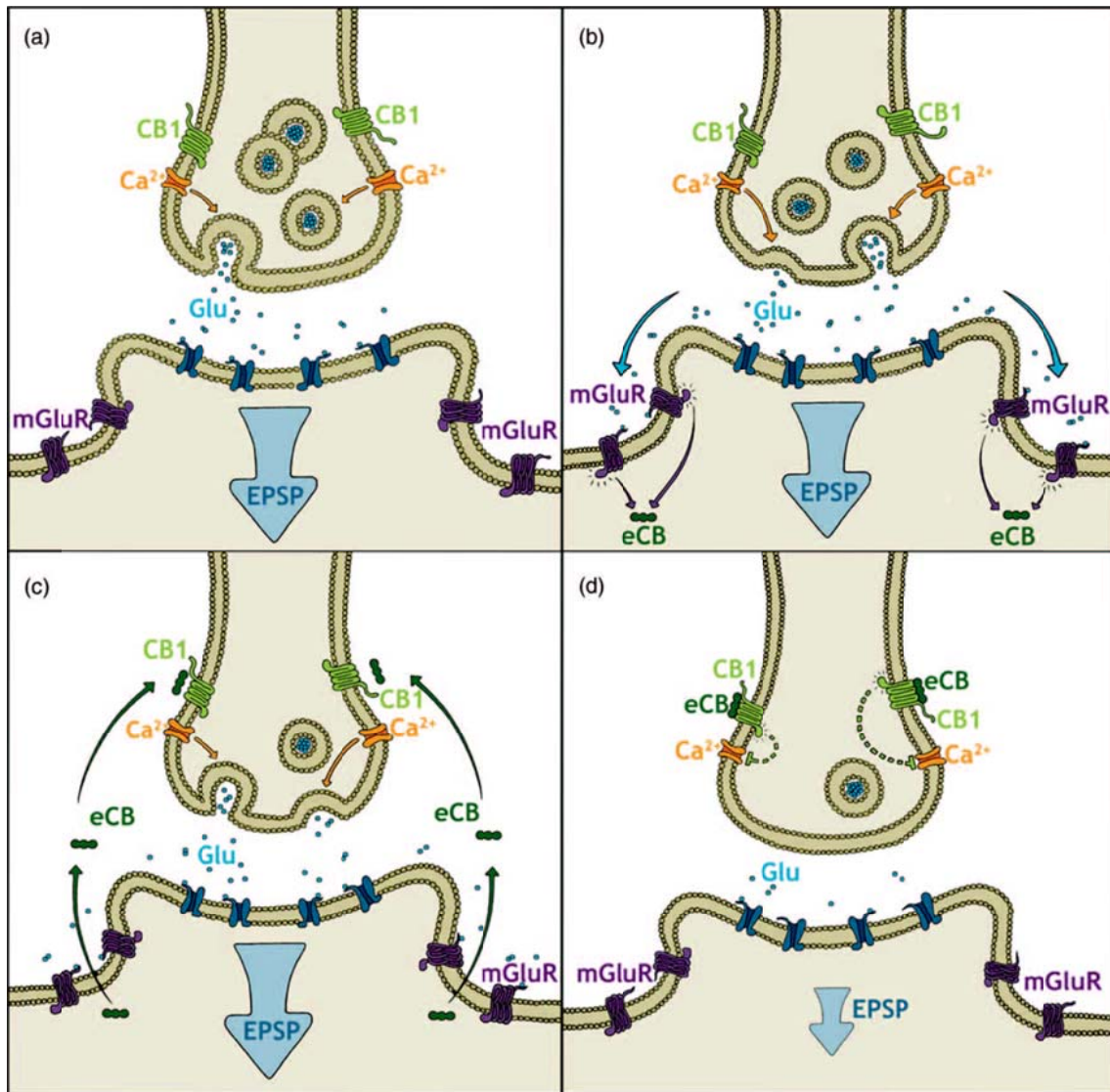


Figura 6. Modelo de señalización retrógrada endocannabinoide en una sinapsis glutamatergica. (a) Niveles moderados de glutamato (Glu) son liberados produciendo la activación de receptores ionotrópicos postsinápticos lo que provoca la creación de un potencial excitatorio postsináptico (EPSP). (b) La liberación prolongada, o el aumento de liberación de glutamato activa a los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G de glutamato (mGluR). Una cascada secundaria de mensajeros activa la síntesis de endocannabinoides (eCB). (c) Estos endocannabinoides viajan a través de la sinapsis para activar receptores CB1 acoplados a proteínas G. (d) La activación de los receptores CB1 inhiben la liberación de glutamato a través del bloqueo de la entrada de calcio a la neurona presináptica, entre otras acciones. La liberación de glutamato entonces se ve inhibida y se atenúa el EPSP. Tomada de Riebe y Wotjak, 2011.

2.2.1. El papel del sistema endocannabinoide en la adicción a drogas de abuso

Cada vez existen un mayor número de evidencias que asocian al SEC con la adquisición y el mantenimiento del comportamiento de consumo de drogas, y lo relacionan con varios procesos fisiológicos y conductuales asociados a la adicción

(Serrano y Parsons, 2011). De hecho, se ha observado que existe una alta densidad de receptores CB1 en regiones cerebrales implicadas en las propiedades motivacionales y adictivas de las drogas de abuso, y que el consumo de cannabis, cuyo principal compuesto activo, el THC, es agonista del receptor CB1, produce alteraciones en los efectos de otras drogas de abuso (Viveros *et al.*, 2011, 2012a; Serrano y Parsons, 2011). Además, se ha descrito que los polimorfismos presentes en los genes que codifican para el receptor CB1 y la FAAH pueden emplearse como herramientas genéticas para el estudio de la susceptibilidad a la adicción a drogas (López-Moreno *et al.*, 2012).

Actualmente, y gracias a estudios con modelos animales, se tiene constancia de que el consumo de drogas (no cannabinoides) produce alteraciones en los niveles cerebrales tanto de AEA como de 2-AG, aunque con unos perfiles distintos entre ambos endocannabinoides y dependiendo del tipo de droga y el patrón de administración (Serrano y Parsons, 2011). Así, la administración de 20 mg/kg de cocaína produjo un aumento significativo de 2-AG en el sistema límbico de ratones macho, sin cambios en los niveles de AEA (Patel *et al.*, 2003), mientras que la administración a ratones adultos de 15 mg/kg dos veces al día durante 10 días seguidos produjo una disminución de los niveles de 2-AG en esta misma región cerebral, sin cambios en los niveles de AEA (González *et al.*, 2002a). Asimismo, las drogas de abuso parecen también ser capaces de alterar la expresión de los receptores CB1. Por ejemplo, en un estudio de nuestro grupo observamos un aumento de la densidad de receptores CB1 en el hipocampo y una disminución en el estriado a largo plazo tras un tratamiento crónico adolescente de nicotina (0,4 mg/kg durante 10 días) en ratas Wistar de ambos sexos (Marco *et al.*, 2007a).

El SEC está implicado en los efectos de diversas drogas de abuso, por ejemplo, en la modulación de sus propiedades reforzantes. A este respecto, en estudios animales, se ha visto que la delección del receptor CB1 o su bloqueo mediante tratamientos con antagonistas cannabinoides producen una disminución de la preferencia condicionada de lugar (CPP, del inglés *conditioned place preference*) y de la autoadministración de morfina, heroína, nicotina y alcohol (Forget *et al.*, 2005; Houchi *et al.*, 2005; Solinas *et al.*, 2005; Thanos *et al.*, 2005; Le Foll y Goldberg, 2004; Castañé *et al.*, 2002; Cossu *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2000); y, aunque existen datos contradictorios, el bloqueo del receptor CB1 también parece afectar a los efectos

reforzantes de los psicoestimulantes. Así, por ejemplo, el AM251, un antagonista del receptor CB1, atenuó la motivación por la autoadministración de cocaína (Xi *et al.*, 2008) y de metanfetamina (Vinklerova *et al.*, 2002) en ratas macho, y la delección del receptor CB1 alteró la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína en ratones macho (Soria *et al.*, 2005). Menos estudiado ha sido el efecto del aumento del tono endocannabinoide mediante la inhibición de las enzimas encargadas de la degradación de los endocannabinoides sobre las propiedades reforzantes de las drogas de abuso. En este ámbito se ha visto que la administración en ratas macho del inhibidor de la FAAH, el URB597, bloquea tanto la CPP como la autoadministración de nicotina mediante la activación del PPAR- α , y no del CB1R (Luchicchi *et al.*, 2010; Scherma *et al.*, 2008). Sin embargo, el URB597 no fue capaz de atenuar los efectos de recompensa de drogas tales como la cocaína o la heroína (Adamczyk *et al.*, 2009; Solinas *et al.*, 2005).

Una de los comportamientos característicos de la adicción es la búsqueda compulsiva de la droga o *craving*. Este hecho puede asociarse a la alta incidencia de recaídas tras periodos de abstinencia. Diversos trabajos empleando modelos animales han demostrado que el uso de agonistas cannabinoides reinstauran la conducta de búsqueda de la droga (López-Moreno *et al.*, 2004; Spano *et al.*, 2004; De Vries *et al.*, 2001, 2003), mientras que el uso de un antagonista del receptor CB1 atenúa esta conducta (Justinova *et al.*, 2008; Fattore *et al.*, 2005; De Vries *et al.*, 2001, 2003).

Existen una gran variedad de ejemplos en la literatura clínica y preclínica que demuestran que diversas formas de estrés están implicadas en la etiología y el mantenimiento de la dependencia a drogas (Kreek *et al.*, 2012; Neisewander *et al.*, 2012; Schank *et al.*, 2012). A su vez, la abstinencia a la mayoría de las drogas está asociada a un aumento de síntomas afectivos negativos, como son la ansiedad y la depresión (Janiri *et al.*, 2005; Nunes y Levin, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Coffey *et al.*, 2000). Como hemos descrito en el apartado anterior, el SEC se encuentra implicado en la regulación de la respuesta de estrés, así como de los estados emocionales (Riebe y Wotjak, 2011; Marco y Viveros, 2009). Por tanto, alteraciones en el SEC podrían producir un aumento de la susceptibilidad al comienzo y al mantenimiento del abuso de drogas, y podrían afectar negativamente el tratamiento de los trastornos adictivos.

2.2.2. Modulación por parte del sistema endocannabinoide de la extinción de memorias aversivas

Existen diversas evidencias que indican que el SEC está específicamente implicado en la extinción de conductas que permiten al individuo evitar un estímulo aversivo [ver revisiones de Trezza y Campolongo (2013), Riebe *et al.* (2012) y Ruehle *et al.* (2011)], aunque no en la adquisición de las memorias relacionadas con esta conducta (Moreira y Wotjak, 2009). Marsicano *et al.* (2002) observaron cómo ratones con una delección para el gen que codifica para el receptor CB1 y ratones tratados con un antagonista del receptor CB1, el rimonabant, exhibían una extinción alterada en el test de miedo condicionado, sin cambios en la adquisición y la consolidación de memorias. En el sentido opuesto, el tratamiento de ratas macho con el agonista del receptor CB1, el WIN-55,212, facilitó la extinción del miedo tras la exposición repetida de los animales al contexto en el que el estímulo aversivo fue suministrado (Pamplona *et al.*, 2006). También ha sido estudiado el efecto que tiene el aumento del tono endocannabinoide, mediante el uso de inhibidores de la recaptura o de la FAAH, sobre la extinción de memorias aversivas. Así, Chhatwal *et al.* (2005) describieron una mejoría del fenómeno de extinción en ratas macho tratadas con AM404, un inhibidor de la recaptura de los endocannabinoides. Además, vieron que este proceso era dependiente del receptor CB1 ya que el uso de rimonabant bloqueaba tal efecto (Chhatwal *et al.*, 2005). Estos datos indican que el SEC está involucrado en la extinción de memorias. Sin embargo, este efecto parece ser específico para la extinción de memorias aversivas, y no de memorias positivas, ya que, ni ratones deficientes en el gen que codifica para el receptor CB1 (Holter *et al.*, 2005) ni ratones tratados con rimonabant (Niyuhire *et al.*, 2007) exhibieron un déficit de extinción en una tarea de condicionamiento operante motivada por el apetito (Mechoulam y Parker, 2013; Viveros *et al.*, 2007a). Cabe destacar, además, que el grado de aversión del estímulo negativo debe exceder un cierto umbral antes de que el SEC sea activado y mitigue la respuesta al miedo (Riebe *et al.*, 2012; Kamprath *et al.*, 2009), por lo que el SEC parece servir como un sistema de protección que previene la aparición de respuestas exageradas al miedo (Moreira y Wotjak, 2009).

3. LA ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO

Ha sido documentado, a lo largo de la historia, el consumo recreacional de sustancias psicoactivas por parte de los seres humanos. Por ejemplo, el pueblo asirio (cuyo dominio abarca desde el segundo milenio a.C. hasta el siglo VI a.C.) usaba el cannabis por sus efectos psicoactivos, aunque también por sus propiedades “medicinales” (Mechoulam y Parker, 2013).

En la actualidad, se sabe con toda certeza que el uso repetido de muchas de estas sustancias psicoactivas puede llegar a producir dependencia y una progresión hacia la adicción (Serrano y Parsons, 2011). La adicción se define como un estado persistente caracterizado por una compulsión a la búsqueda y al consumo de una droga, una pérdida de control a la hora de poner límites en el empleo de la droga, incluso cuando su consumo acarrea importantes consecuencias negativas (Belin y Deroche-Gamonet, 2013). También se caracteriza por la aparición de un estado emocional negativo, en la que el individuo sufre de ansiedad, depresión o irritabilidad, cuando no puede acceder a la droga (Koob y Volkow, 2010; Hyman *et al.*, 2006; Hyman, 2005). El problema más grave de la adicción es que la persona adicta presenta una vulnerabilidad a largo plazo a la recaída al consumo de la droga. Esta recaída puede darse tras haber pasado un par de días tras el último consumo o incluso hasta varios años después, de ahí la gran dificultad para tratar este trastorno psiquiátrico (Yahyavi-Firouz-Abadi y See, 2009; Shaham y Hope, 2005).

Clásicamente se ha considerado que una sustancia actúa como droga de abuso cuando produce un aumento extracelular de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (Di Chiara *et al.*, 2004). Sin embargo, en la actualidad, existen diversos estudios que demuestran que existen otros sistemas de neurotransmisión involucrados en los efectos reforzantes de las drogas de abuso tales como el serotoninérgico, el glutamatérgico, el GABAérgico y, como ya ha sido ampliamente descrito en el apartado anterior, el endocannabinoide (Serrano y Parsons, 2013; Ross y Peselow, 2009; Hyman *et al.*, 2006); y que otras regiones cerebrales, además de las del sistema límbico, juegan un papel importante en los procesos adictivos (Paulus, 2008).

La adicción es un trastorno cerebral muy complejo asociado a una disfunción de los sistemas que controlan la motivación (Kalivas y Volkow, 2005), las emociones (Goldstein *et al.*, 2009), el aprendizaje (Yalachkov *et al.*, 2010; Volkow *et al.*, 2006) y la conducta (Ersche *et al.*, 2011, 2012; Volkow *et al.*, 2010). Desde el punto de vista clásico, se ha considerado que la adicción a una droga se produce mayoritariamente debido a los cambios neuroadaptativos que produce la droga sobre el cerebro, sin embargo, en los últimos años se ha acumulado información que sugiere que tiene una naturaleza más compleja que incluye una predisposición genética y otros factores tales como un fenotipo vulnerable, las características de la propia droga y el ambiente (Belin y Deroche-Gamonet, 2013).

La mayoría de las personas que consumen drogas de abuso comienzan durante la adolescencia (Hittner y Swickert, 2006; Kelly *et al.*, 2006). Como ya hemos visto en el primer apartado de la Introducción, los adolescentes presentan unas diferencias muy marcadas respecto a los individuos adultos en relación con los efectos adictivos de las drogas de abuso [ver revisión de Schramm-Sapyta *et al.* (2009)]. Estas diferencias facilitan enormemente el inicio en el consumo, lo que causa, en última instancia, que esta sea la época de la vida en la que se produce el mayor número de casos de adicción a una o varias drogas de abuso. Otro problema añadido es que la adolescencia es un periodo caracterizado por importantes cambios del sistema nervioso central, el cual presenta una plasticidad única y, por lo tanto, representa un periodo crítico del neurodesarrollo (Viveros *et al.*, 2012a). Por ello, el consumo de drogas durante la adolescencia puede alterar el correcto desarrollo del cerebro y, por ende, puede producir, a largo plazo, diversas psicopatologías. Así, diversos estudios han demostrado que el consumo crónico durante la adolescencia de cannabis provoca alteraciones persistentes sobre el cerebro y sobre la conducta similares a los encontrados en pacientes esquizofrénicos (Henquet *et al.*, 2005; Arseneault *et al.*, 2002; van Os *et al.*, 2002).

Todo lo anterior recalca la importancia de caracterizar modelos animales que mimeticen al máximo posible, dentro de las limitaciones que ofrecen el uso de estos modelos, los patrones de consumo de drogas que se dan entre los jóvenes en la actualidad. Por este motivo, en la presente Tesis Doctoral, tratamos crónicamente con diversas drogas de abuso a ratas *Wistar* adolescentes. Estos tratamientos, además, se realizaron con las drogas de abuso ilícitas que con mayor frecuencia son consumidas

entre los jóvenes españoles, según reporta la encuesta estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES) del año 2010. En esta encuesta se observa que el cannabis es la droga ilícita que se consume con mayor frecuencia (32%), seguida de la cocaína (3%) y por el éxtasis y las anfetaminas (2%) (Fig. 7) (EMCDDA, 2012).

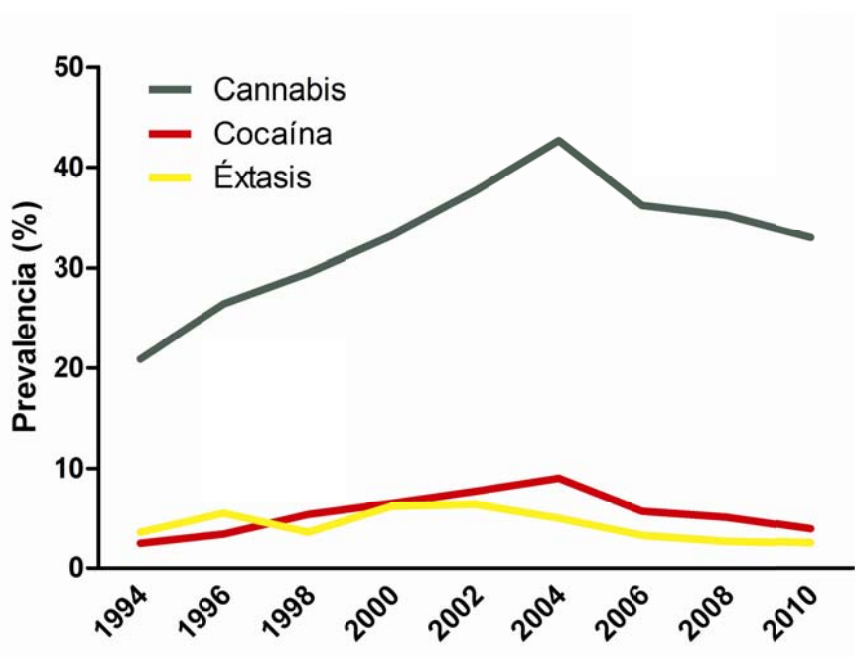


Figura 7. Evolución de la prevalencia de consumo (en porcentaje) de cannabis, cocaína y éxtasis entre los estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14-18 años en España entre los años 1994 y 2010. Fuente: Encuesta estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES), 2010.

A pesar de que el consumo de estas tres drogas de comercio ilegal es mucho mayor en los hombres que en las mujeres (Fig 8), las mujeres están alcanzando a los hombres en la prevalencia de consumo de estas sustancias (Becker, 2009). Además, existen numerosos estudios que indican que las mujeres son más sensibles al efecto de las drogas de abuso (Viveros *et al.*, 2012b). De ahí que, en los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral, estén representados ambos sexos.

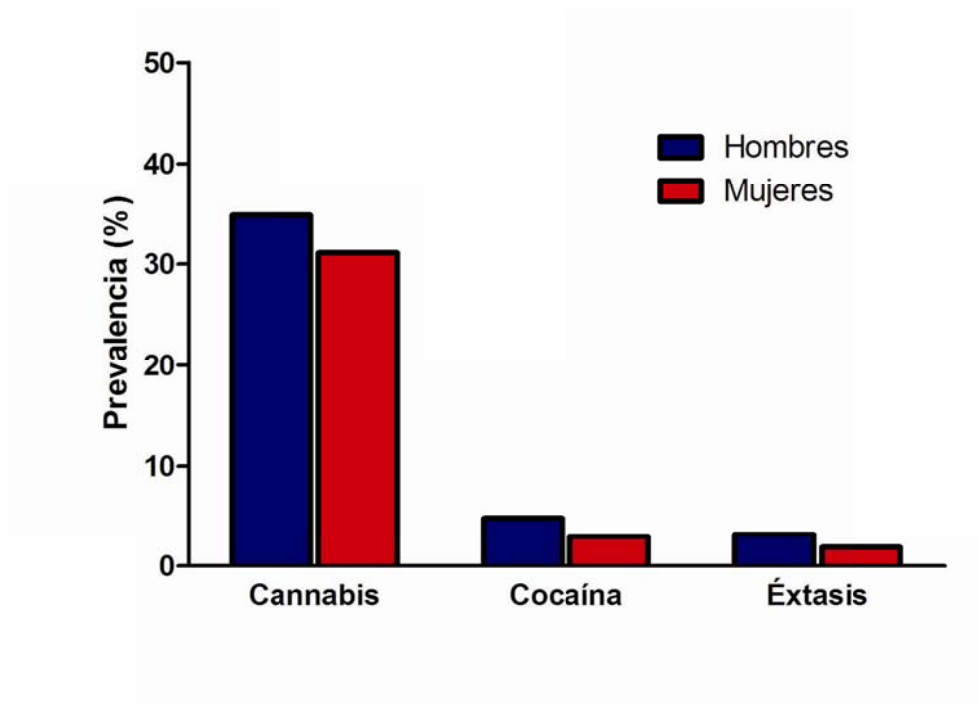


Figura 8. Prevalencia en el consumo (en porcentaje) de cannabis, cocaína y éxtasis por sexos entre los estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14-18 años en España en el año 2010. Fuente: Encuesta estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES), 2010.

3.1. El cannabis

El cannabis es la droga ilegal con mayor disponibilidad en Europa. Se estima que han consumido cannabis en algún momento de su vida un total de 80,5 millones de europeos. Sin embargo, su consumo varía enormemente entre países, así, en Rumania, la prevalencia de consumo es tan solo de un 1,6%, mientras que en países como Dinamarca, España, Francia, Italia y Reino Unido más de un 30% de la población, casi una de cada tres personas, lo habrían consumido en algún momento de su vida (EMCDDA, 2012).

El cannabis se obtiene a partir de derivados de la planta *Cannabis sativa* o planta de cáñamo (Fig. 9A), la cual posee al menos un total de 80 compuestos psicoactivos. Sin embargo, los efectos psicotrópicos de la planta se deben principalmente a uno de ellos, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Klein *et al.*, 2011; Bossong y Niesink, 2010). Los dos productos, derivados de la planta de cáñamo, que más ampliamente son consumidos por su alto contenido en THC, son las flores secas sin procesar y el hachís o resina de cannabis (Fig. 9B y 9C).

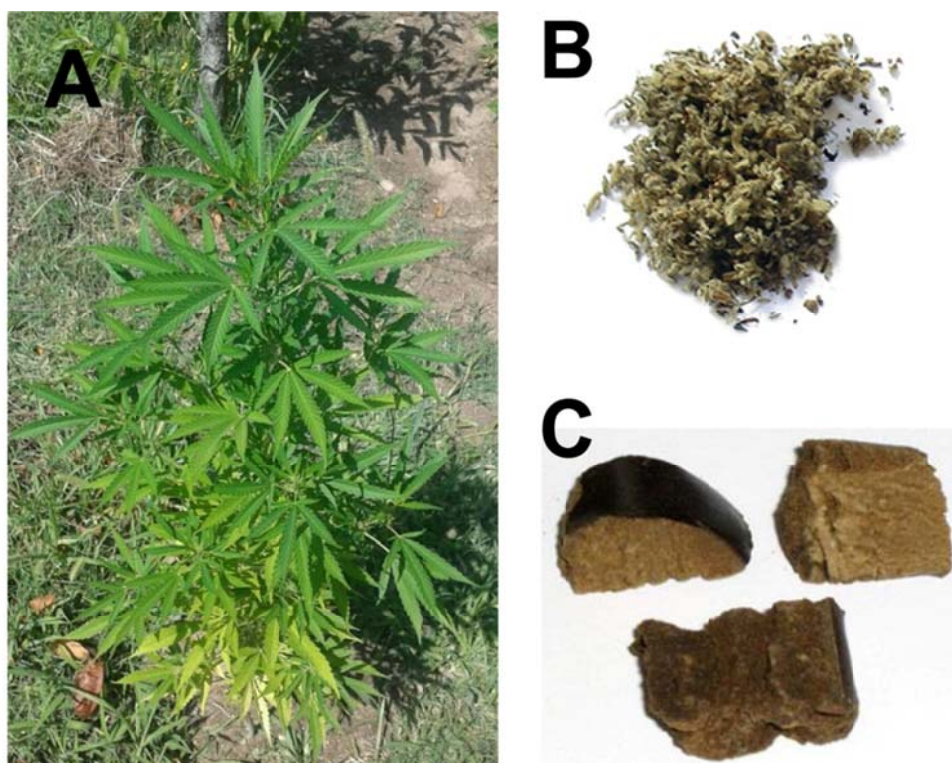


Figura 9. Planta de *Cannabis sativa* y sus derivados. (A) Planta de *Cannabis sativa*. (B) Cannabis sin procesar, proveniente de las flores secas, las hojas subyacentes y los tallos de ejemplares hembra de la planta de cáñamo. (C) Hachís, resina concentrada que se produce a partir de las flores de la planta de cáñamo hembra.

El THC ejerce su influencia sobre el sistema nervioso central a través de los receptores cannabinoides, mayoritariamente el receptor CB1 (Klein *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2006; Malone y Taylor, 2006). El consumo de cannabis provoca una sensación de euforia que suele ir acompañada de una reducción de los niveles de ansiedad y un incremento de las conductas sociales. Sin embargo, el cannabis también puede provocar disforia, ansiedad, pánico, paranoia y psicosis (Crippa *et al.*, 2010).

El uso de cannabis se encuentra altamente concentrado en la gente joven (entre los 15 y los 34 años de edad), con la mayor prevalencia de uso durante el último año entre los individuos de 15 a 24 años (EMCDDA, 2012). Esto supone un grave problema de salud debido a que existen un gran número de evidencias que relacionan el consumo de cannabis durante la adolescencia con un incremento de las posibilidades de sufrir trastornos psiquiátricos en la etapa adulta (Viveros *et al.*, 2011, 2012a; Fernández-Espejo *et al.*, 2009). Se ha visto que la intoxicación aguda con cannabis produce un síndrome con características similares a las de un estado psicótico: confusión,

despersonalización, paranoia, alucinaciones, ansiedad y agitación. Estos efectos pueden tender a desaparecer cuando el THC desaparece de la sangre, sin embargo, un consumo reiterado de cannabis puede producir alteraciones permanentes de la química del cerebro, lo que originaría una sintomatología psicótica de una forma similar a como lo hacen otras drogas de abuso, como por ejemplo los psicoestimulantes (Fernández-Espejo *et al.*, 2009). Estos cambios sobre el sistema nervioso central terminan desembocando en una dependencia, a pesar de la extendida creencia de que el cannabis es una droga que no produce síndrome de abstinencia. De hecho, el síndrome de abstinencia producido por el cannabis se caracteriza por irritabilidad, ansiedad, depresión, anhedonia, dificultad para dormir y *craving* (Vandrey *et al.*, 2008; Budney *et al.*, 2004; Tanda y Goldberg, 2003).

Además, el inicio temprano en el consumo de cannabis ha sido estrechamente relacionado con el inicio y el desarrollo de problemas adictivos con otras drogas de abuso (EMCDDA, 2012). Así, existen en la actualidad dos teorías para intentar explicar este fenómeno (Viveros *et al.*, 2012a). En la primera, conocida como “teoría de la puerta de entrada” se sugiere que una vez que un individuo ha decidido consumir una droga de abuso, existe una mayor propensión a utilizar una distinta (Wagner y Anthony, 2002). En la segunda, o modelo del factor de riesgo común, Agrawal *et al.* (2004) sugirieron que los mismos factores, tanto genéticos como ambientales, que conducen al consumo de una droga incrementan el riesgo de consumir otra distinta. En cualquier caso, parece común el hecho de que sea el cannabis la primera droga ilícita en consumirse, antes de iniciar el consumo de drogas “más fuertes”. Esto puede deberse a la disponibilidad de la droga y a la facilidad que tienen los jóvenes para obtenerla. Así, según la encuesta estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES) del año 2010, el cannabis es la droga ilícita con mayor percepción de disponibilidad entre los jóvenes españoles (ESTUDES, 2010).

La investigación básica ha aportado además datos muy claros de cómo la exposición a cannabinoides durante la adolescencia (Biscaia *et al.*, 2008; Higuera-Matas *et al.*, 2008; Ellgren *et al.*, 2006) o incluso durante el período perinatal (Vela *et al.*, 1998) pueden llevar a cambios en los sistemas de recompensa del cerebro y a una mayor autoadministración de otras drogas tales como opiáceos y psicoestimulantes,

proporcionando una base neurobiológica a la teoría de que el consumo de cannabis puede de hecho facilitar el consumo de otras drogas.

3.2. La cocaína

Tras el cannabis, la cocaína es la droga con la que más se trafica en todo el mundo, y es la segunda droga más consumida en Europa. Se estima que un 4,6% de los europeos la han probado alguna vez en su vida. España es el país europeo donde más se consume esta droga, con una prevalencia de consumo en el último año del 2,7%, seguida de cerca por el Reino Unido (2,2%). Respecto al consumo entre los jóvenes, se estima que alrededor de 8 millones de europeos de entre 15 y 34 años han consumido cocaína al menos una vez en su vida (EMCDDA, 2012).

La fuente de la cocaína es la denominada planta de coca (*Erythroxylum coca*) cuyo cultivo se encuentra concentrado en tres países andinos, Colombia, Perú y Bolivia (EMCDDA, 2012). La cocaína se comercializa en forma de sal (clorhidrato de cocaína), que contiene entre un 12 y un 75% de cocaína, o en forma de *crack* que es una forma de base libre mucho más purificada (80% de cocaína) y que tiene forma de cristales blancos. La sal puede consumirse tópicamente, esnifada, o por vía intravenosa mientras que el *crack* se fuma (Miñarro, 2012; Lizasoain *et al.*, 2002). La cocaína es una sustancia lipofílica que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica. Es rápidamente metabolizada, generalmente por hidrólisis enzimática, para producir benzoilecgonina y ecgonina, careciendo ambos metabolitos de actividad biológica significativa (Büttner *et al.*, 2003; Lizasoain *et al.*, 2002). Sin embargo, en presencia de alcohol, la cocaína es metabolizada a cocaetileno, el cual cruza rápidamente la barrera hematoencefálica y produce un perfil farmacológico similar al de la cocaína (Büttner *et al.*, 2003).

La cocaína produce sus efectos de refuerzo a través del aumento de los niveles de dopamina extracelulares en los terminales dopaminérgicos del sistema mesocorticolímbico y nigroestriatal provocado por el bloqueo de la recaptación de dopamina (Fig. 10), así como por la activación de la tirosina hidroxilasa (Kreek *et al.*, 2012; Büttner *et al.*, 2003). El principal efecto agudo de la cocaína es una intensa sensación de euforia, debida sobre todo al aumento de la estimulación del sistema

dopaminérgico, así como un aumento de la energía, del estado de alerta y de la confianza en sí mismo. Sin embargo, elevadas dosis de cocaína pueden producir alteraciones graves de la conducta, inquietud, ansiedad, agitación, psicosis paranoide y, a menudo, un comportamiento agresivo (Prakash y Das, 1993).

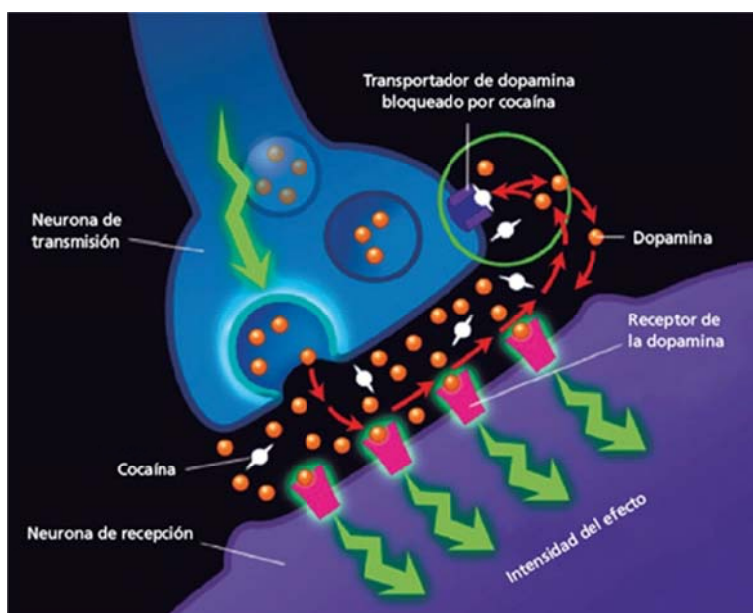


Figura 10. Mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína bloquea el proceso de reciclaje provocando una acumulación de dopamina en la sinapsis. Tomada de Miñarro, 2012.

El uso regular de cocaína puede asociarse a diversos problemas cardiovasculares, neurológicos y psiquiátricos, así como con el riesgo a sufrir accidentes y la transmisión de enfermedades infecciosas, bien mediante relaciones sexuales sin protección (Brugal *et al.*, 2009) o, incluso, mediante el uso compartido del rulo para esnifar (Aaron *et al.*, 2008). Entre los efectos neuropsiquiátricos potencialmente letales de la cocaína se encuentran las conductas suicidas, la aparición de psicosis violentas, los ataques cerebrovasculares y las encefalopatías (Nnadi *et al.*, 2005). Además, un número de complicaciones neuropsiquiátricas silentes han sido descritas en consumidores a largo plazo de cocaína, tales como ansiedad (Montoya *et al.*, 1995), una excitabilidad frontolímbica alterada (Adinoff *et al.*, 2001; Boutros *et al.*, 2001), y alteraciones psicomotoras, neuroquímicas y neuroisquémicas (Bechara *et al.*, 2001; Herning *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1997; Bauer, 1996).

3.3. El éxtasis

El éxtasis es una droga sintética cuyo consumo, en los últimos años, se encuentra concentrado entre los jóvenes, siendo los hombres los que generalmente reportan unos mayores niveles de uso que las mujeres. La prevalencia de uso de éxtasis en jóvenes de entre 15 y 16 años varía en un rango de entre un 1 y un 4% entre los diversos países europeos (EMCDDA, 2012). En España, la edad media para el inicio del consumo de este psicoestimulante es de 15,3 años y en el 2010 se observó una prevalencia de consumo entre los jóvenes de entre 14 y 18 años del 3,2% en los varones y del 1,9 en las mujeres (ESTUDES, 2010). El éxtasis es generalmente consumido como una droga recreacional entre jóvenes que asisten a fiestas “rave” o de música electrónica (Schenk, 2011; Parrott, 2004, 2007). Así, en una encuesta realizada entre los jóvenes que asisten a este tipo de fiestas en Ámsterdam, se observó que la prevalencia de uso de esta droga se sitúa en torno al 33% (EMCDDA, 2012).

El éxtasis posee como principal componente activo la MDMA o 3,4-metilendioximetanfetamina. Este compuesto fue sintetizado por Anton Kollisch hace más de 100 años y fue patentado por la compañía farmacéutica Merck en el año 1912 como intermediario químico en la producción de hidrastinina, un astringente para el control de la coagulación (Piper, 2007). El éxtasis se vende generalmente en forma de pastillas (Fig. 11B) que contienen un alto contenido en MDMA; en 2010 la media del contenido de MDMA en cada pastilla de éxtasis fue de entre 3 y 104 mg (EMCDDA, 2012). Sin embargo, aparte de la MDMA, existen otros análogos que pueden encontrarse también, aunque en proporciones más bajas, como son la MDA (3,4-metilendioxianfetamina), la MDEA (3,4-metilendioxietilamfetamina) y la MBDB (N-metil-1-3,4-metilenodioxifenil-2 butamina) (Fig. 11A) (EMCDDA, 2012; Gouzoulis-Mayfrank y Daumann, 2009).

La MDMA es un derivado anfetamínico derivado de la β -feniletilamina (Fig. 11A) que se une, principalmente, a los transportadores de serotonina y dopamina, provocando una liberación de neurotransmisores a través de la inhibición de su recaptación y la reversión de sus transportadores (Palenicek *et al.*, 2005; Parrott, 2004, 2007). En los seres humanos, la MDMA causa euforia además de un aumento de la energía y de la sociabilidad (Schenk, 2011; Palenicek *et al.*, 2005). También produce diversos síntomas fisiológicos como son un incremento de la presión sanguínea, de la

tasa cardíaca, de la temperatura corporal y del sudor así como la aparición de midriasis (Palenicek *et al.*, 2005). Entre sus efectos deletéreos desde el punto de vista fisiológico se han descrito un elevado número de síntomas adversos tales como un trastorno de la termorregulación, taquicardias, hipertensión, infartos, hemorragias cerebrales y una función inmune alterada, lo que puede causar, en última instancia, una serie de efectos que si no son tratados pueden llegar a ser mortales, como por ejemplo rabdomiolisis, hiponatremia, coagulación intravenosa diseminada, fallo renal agudo y/o un aumento de la susceptibilidad a sufrir enfermedades infecciosas. (Mohamed *et al.*, 2011).

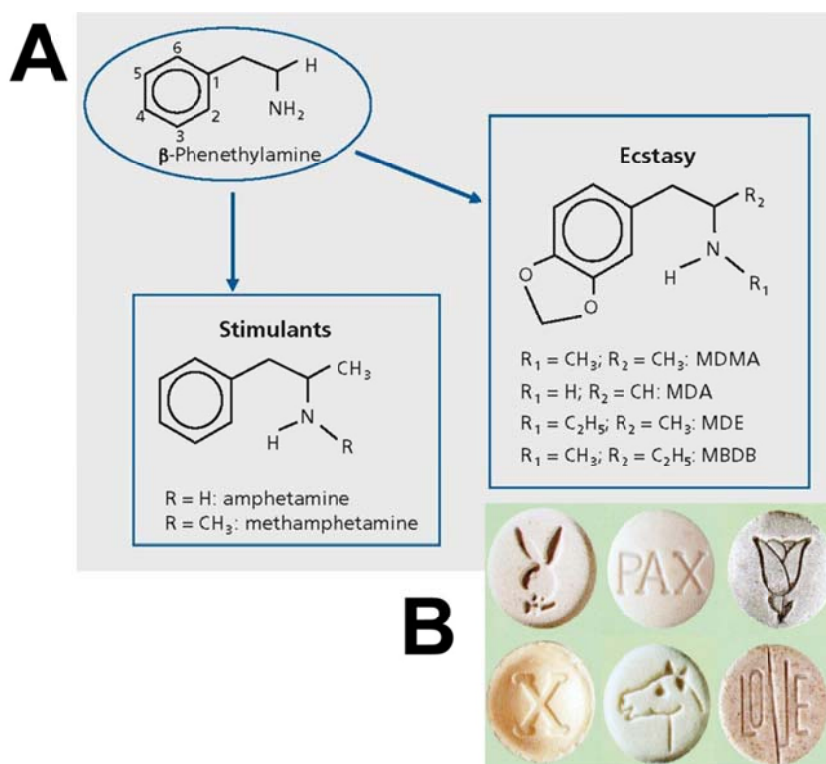


Figura 11. (A) Estructura química de los derivados de la β -feniletilamina (β -phenethylamine). Al introducir un grupo metilo en la región adyacente al grupo amino de la cadena lateral obtenemos estimulantes (stimulants) tales como la anfetamina (amphetamine) y la metanfetamina (methamphetamine), mientras que el éxtasis (ecstasy) son feniletilaminas sustituidas: MDMA (3,4-metilendioximetanfetamina), MDA (3,4-metilendioxianfetamina), MDE (MDEA, 3,4-metilendioxietilamfetamina), MBDB (N-metil-1-3,4-metilenodioxifenil-2 butamina). (B) Pastillas de éxtasis. Modificada de Gouzoulis-Mayfrank y Daumann, 2009.

La MDMA es un potente compuesto neurotóxico del sistema serotoninérgico (Parrott *et al.*, 2007). Existen evidencias de que el consumo continuado de esta

sustancia provoca a largo plazo una importante reducción de la densidad de transportadores de serotonina en los seres humanos y en ratas [ver revisiones de Mohamed *et al.*, (2011), Baumann *et al.* (2007) y Piper (2007)]. Asimismo, el consumo continuado de éxtasis se ha relacionado con la aparición de un gran número de trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo alteraciones del control de los impulsos, inestabilidad emocional y episodios psicóticos, así como con déficits cognitivos (Mohamed *et al.*, 2011; Parrott *et al.*, 2007).

Muchos de los consumidores de éxtasis son además consumidores de otras drogas de abuso (Parrott *et al.*, 2007) como el alcohol, la nicotina, el cannabis, la cocaína, la anfetamina y los alucinógenos (Groß *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006; Scholey *et al.*, 2004; Winstock *et al.*, 2001). Este elevado porcentaje de policonsumo entre los consumidores de éxtasis hace pensar que son sustancias de consumo ocasional, es decir, su consumo es secundario o complementario al de otras sustancias y se consumen cuando ya existe una adicción previa a otras drogas de abuso (ESTUDES, 2010). En la presente Tesis Doctoral, hemos tenido en cuenta la alta tasa de policonsumo de MDMA y cannabis entre los jóvenes a la hora de diseñar uno de nuestros objetivos, mediante la utilización de un modelo animal de exposición a ambas drogas de abuso durante la adolescencia.

4. CONDICIONAMIENTO Y EXTINCIÓN DEL MIEDO

El miedo es una respuesta adaptativa que ha evolucionado para proporcionar protección frente a un estímulo que puede ser potencialmente dañino (Graham y Milad, 2011). La sensación de miedo es amoldable y permite al animal ajustar sus respuestas según demande la situación bien aumentándolas o disminuyéndolas (Riebe *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando la intensidad de la respuesta de miedo es excesiva y/o desproporcionada a la situación real, crónica, irreversible y/o no está asociada a ningún riesgo puede conducir a la aparición de trastornos de la ansiedad tales como fobias, trastornos de pánico y trastorno por estrés postraumático (PTSD, del inglés *Post-traumatic stress disorder*) (Graham y Milad, 2011; Ruehle *et al.*, 2011). Se estima que un 25% de los habitantes de países desarrollados han padecido en algún momento algún trastorno de la ansiedad (Kessler *et al.*, 2005a). Sin embargo, lo que más preocupa es que a pesar del incremento del número de individuos que están siendo tratados para alguno de estos trastornos, no se observa una disminución en las tasas de prevalencia (Kessler *et al.*, 2005b).

Tradicionalmente, el tratamiento de los trastornos de la ansiedad ha sido abordado mediante fármacos tales como benzodiacepinas o inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina, los cuales ofrecen un alivio sintomático, pero con el inconveniente de la aparición de recaídas una vez terminado el tratamiento. La terapia cognitiva-conductual (CBT; del inglés *Cognitive-behavioral therapy*) es el tratamiento psicológico que ofrece mejores resultados para el tratamiento de los trastornos de la ansiedad (Graham y Milad, 2011). Uno de sus componentes más importantes es la terapia de exposición que consiste en exponer gradualmente al paciente al estímulo que se teme, en ausencia de peligro. A pesar de que la CBT es una terapia que tiene buenos resultados, no todos los pacientes son capaces de completarla y algunos de ellos son incapaces de mantener sus efectos beneficiosos tras largos intervalos de tiempo (Hofmann y Smits, 2008; McNally, 2007).

4.1. Las respuestas de miedo

El enfrentamiento con amenazas reales o potenciales conlleva la activación de una gran variedad de respuestas de alarma o respuestas de miedo, que pueden ser clasificadas según el tipo de efector que esté involucrado, así, por ejemplo, podemos encontrarnos con respuestas vegetativas, respuestas conductuales o respuestas hormonales. Las respuestas de miedo son altamente adaptativas y permiten la supervivencia en ambientes peligrosos. También son reflexivas, es decir, generan un patrón de respuesta automática mediante la activación de efectores de la matriz del miedo (Riebe *et al.*, 2012)

La matriz del miedo puede definirse como el conjunto de estructuras implicadas en las respuestas de miedo. Dentro de la matriz del miedo nos encontramos con regiones cerebrales tales como la amígdala, el hipotálamo lateral, la sustancia gris periacueductal y los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico y nigroestriatal. Las respuestas de miedo, a su vez, se encuentran moduladas por centros de control tales como el hipocampo y el córtex prefrontal (Mahan y Ressler, 2012; Riebe *et al.*, 2012; Kaplan *et al.*, 2011; Myers y Davis, 2007).

En el laboratorio, conseguimos que los animales expresen una respuesta de miedo a través de la adquisición de una memoria aversiva. Este tipo de aprendizaje se obtiene bien por métodos no-asociativos, o bien por métodos asociativos:

- Los métodos no-asociativos, o de condicionamiento operante, conducen a la formación de una respuesta determinada que permite al individuo evitar un estímulo aversivo en el futuro. En este marco también podemos hablar de procesos de sensibilización en los que se produce un aumento de la respuesta de miedo frente a un estímulo amenazante debida a un incremento de la sensibilidad de la matriz del miedo causada por la exposición previa a un estímulo estresante o doloroso (Fig. 12; Riebe *et al.*, 2012).

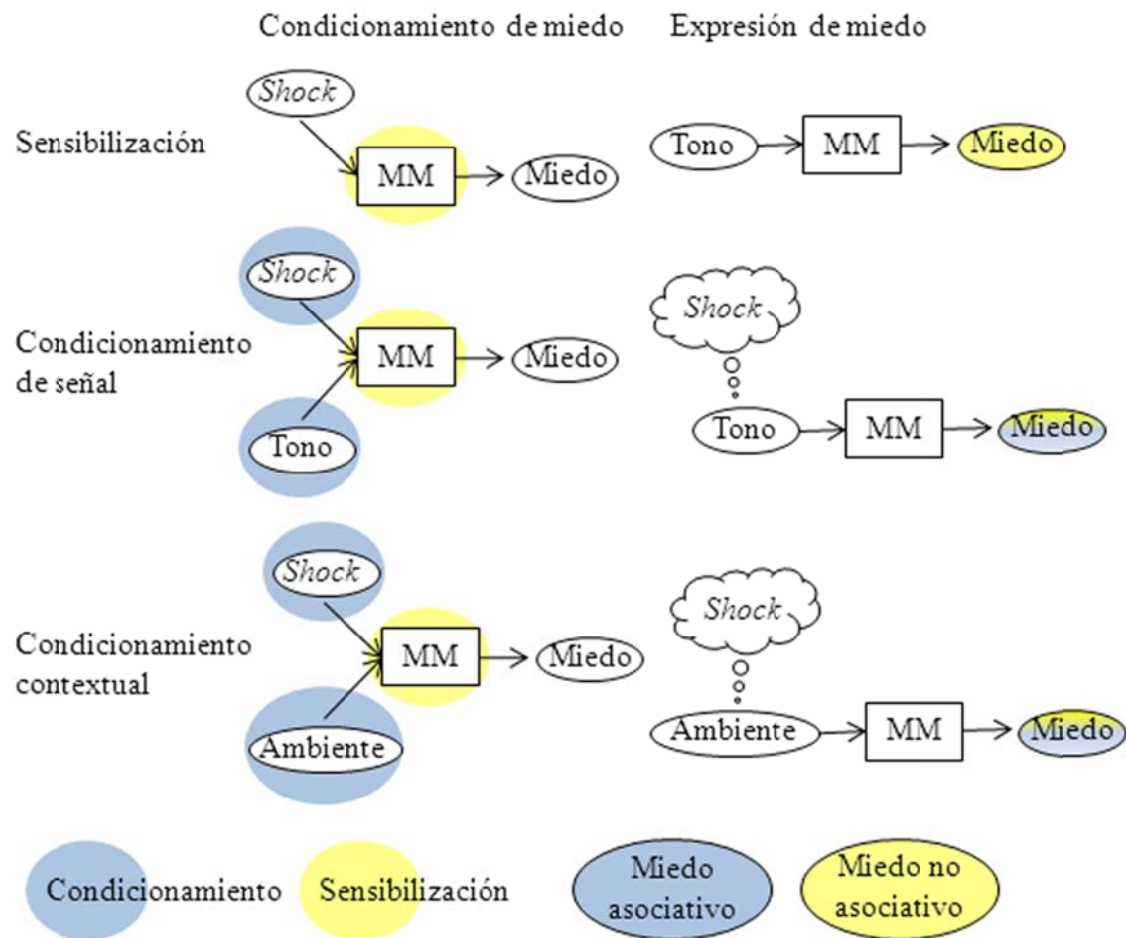


Figura 12. Condicionamiento de miedo Pavloviano-procesos asociativos y no-asociativos. Sensibilización: Estímulos dolorosos o estresantes pueden promover un incremento general del estatus activacional de la matriz del miedo (MM). Como consecuencia, las subsiguientes exposiciones a un estímulo potencialmente amenazante (por ejemplo un tono) provocaría la expresión de respuestas de miedo. Se trata pues de un miedo no-asociativo. Condicionamiento de señal: el emparejamiento de una señal elemental (por ejemplo un tono) con un *shock* eléctrico causa la formación de una asociación tono-*shock*. Al mismo tiempo, el *shock per se* sensibiliza la MM a subsiguientes exposiciones al tono. Consecuentemente, la expresión del miedo condicionado está determinada tanto por componentes asociativos como no-asociativos. Condicionamiento de miedo contextual: en un paso inicial, los animales integran una gran variedad de señales elementales además de la información interoceptiva en una representación configuracional de la situación. En un segundo paso, asocian esta representación con el *shock*. Modificado de Riebe *et al.* (2012).

- El condicionamiento asociativo (también conocido como condicionamiento clásico Pavloviano) se basa en la asociación estímulo-estímulo. Este proceso de aprendizaje asociativo consiste en emparejar un estímulo condicionado (EC) que tiene naturaleza neutral con un estímulo incondicionado (EI) de naturaleza aversiva. El condicionamiento asociativo puede clasificarse según la naturaleza

del EC, pudiendo ser un condicionamiento de señal, cuando el EC es una señal elemental, como por ejemplo un tono o un estímulo luminoso, o bien un condicionamiento contextual, cuando el EC es el ambiente en el cual el animal recibió el EI (Fig. 12; Andero y Ressler, 2012; Riebe *et al.*, 2012). Es importante diferenciar ambos tipos de condicionamiento ya que las estructuras cerebrales implicadas en su formación son distintas. Así, el hipocampo es totalmente imprescindible para el condicionamiento contextual debido a la gran cantidad de procesos de aprendizaje espacial que deben ser realizados (el animal debe integrar diversos estímulos elementales y formar una representación coherente de la situación), pero puede tener menos relevancia en un condicionamiento de señal (Maren *et al.*, 2013). Otra diferencia fundamental entre ambos tipos de condicionamiento es la manera en la que aparece la memoria de miedo. Así, con el condicionamiento de señal, los animales muestran una respuesta de miedo elevada al comienzo de la exposición que va decayendo con el paso del tiempo, mientras que en el condicionamiento contextual pasa al contrario, i.e. comienzan con unos niveles de miedo bajos que van aumentando con el paso del tiempo (Fig. 13; Riebe *et al.*, 2012).

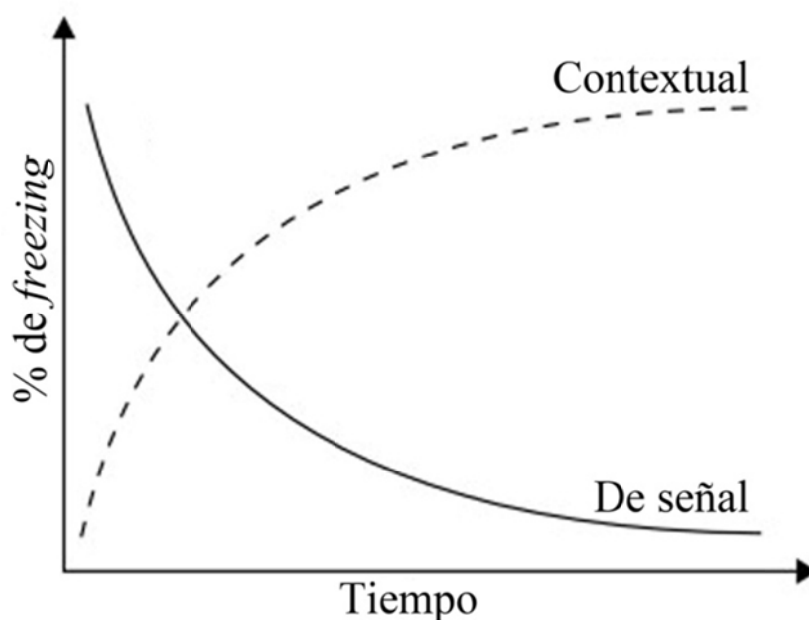


Figura 13. Expresión de miedo tras un condicionamiento de señal y un condicionamiento contextual a lo largo de una sesión de exposición. La reexposición a un estímulo condicionado provoca en ambas formas de condicionamiento asociativo una respuesta de miedo, en este caso *freezing*. Sin embargo, el desarrollo del *freezing* a lo largo de la exposición sigue patrones opuestos para ambas formas de memoria de miedo. Modificado de Riebe *et al.* (2012).

4.2. Alivio del miedo

Otro aspecto importante de la plasticidad del miedo es la habilidad de los animales de reconocer la ausencia y/o desaparición de una amenaza y adaptarse a las nuevas condiciones. Existe un gran número de procesos distintos cuyo resultado final es la disminución de las respuestas de miedo y que pueden basarse, o no, en una (re)exposición a un estímulo neutro [para mayor información ver Riebe *et al.* (2012)]:

- Olvido. Consiste en la pérdida de la memoria aversiva simplemente debido al paso del tiempo.
- Borrado de la memoria. Describe la reversión de los cambios plásticos acaecidos en la matriz del miedo que han causado la asociación estímulo-castigo durante el proceso de condicionamiento de miedo.
- Extinción. Se basa en el desarrollo de nuevas memorias inhibitorias que suprimen la memoria de miedo original. La consiguiente disminución de las respuestas de miedo podría deberse a los siguientes procesos:
 - o Habitación a largo plazo (Fig. 14A). Consiste en una disminución paulatina y persistente de la transmisión sináptica de la vía que asocia el estímulo con la respuesta de miedo. Podemos decir entonces que la habituación es dependiente del estímulo y por ello las respuestas de miedo provenientes de otros estímulos, que no se hallaron presentes en las fases de extinción, se encuentran inalteradas.
 - o Desensibilización (Fig. 14B). Describe la reversión de los cambios no-asociativos ocurridos en la matriz del miedo durante el condicionamiento, es decir, se produce una desensibilización de la matriz del miedo que causa que los animales muestren una respuesta de miedo menor ante la presencia de un estímulo amenazante.
 - o Re-aprendizaje (Fig. 14C). La exposición repetida al EC provoca la formación de una nueva memoria que asociaría la presencia del EC con la ausencia del EI y que terminaría inhibiendo la expresión de la memoria de miedo original.

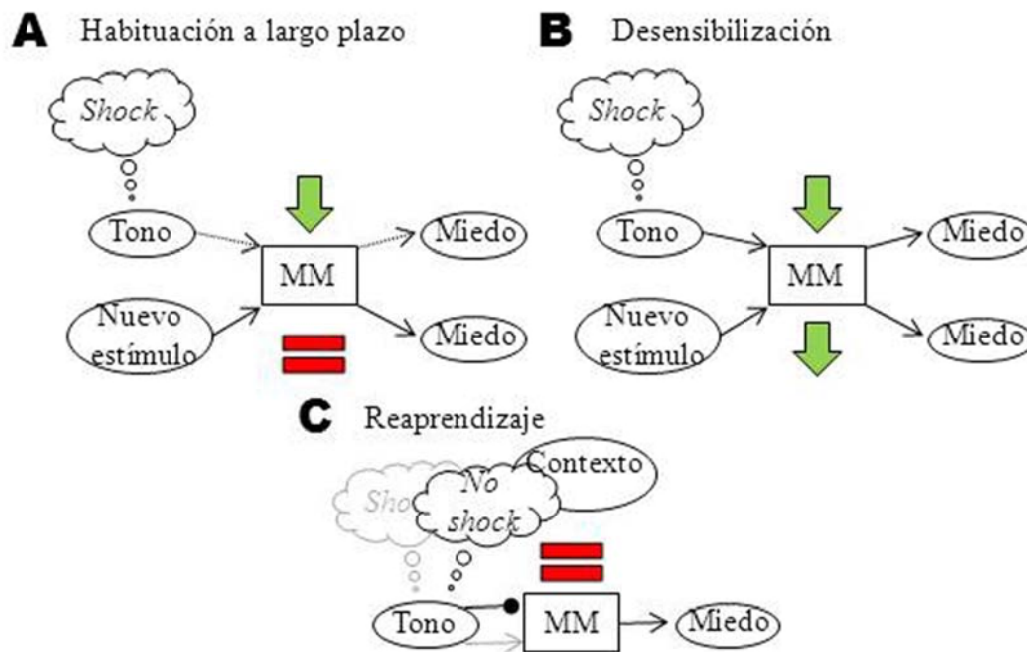


Figura 14. Descripción esquemática de los diferentes procesos que pueden ocurrir durante la extinción de una memoria aversiva. (A) Habitación a largo plazo. La exposición a un tono produce la disminución de la transmisión sináptica de la vía tono-respuesta en particular, lo que conduce a una disminución de la respuesta de miedo frente a ese estímulo específico. Los cambios no-asociativos de la matriz del miedo (MM), sin embargo, permanecen inalterados. (B) Desensibilización. Se produce una reversión inespecífica de los cambios no-asociativos de la MM, es decir, una pérdida de la sensibilización, que causa una disminución del miedo independientemente del estímulo. (C) Reaprendizaje. La formación de un componente narrativo secundario produce una competición entre una memoria activadora (original) y una inhibitoria (nueva memoria) de la MM que puede bien activar o bien suprimir la expresión de miedo condicionado. Las flechas verdes apuntando hacia abajo simbolizan una disminución, mientras que los signos de igual simbolizan el mantenimiento de unos niveles elevados, del estatus activacional de la MM. Modificado de Riebe *et al.* (2012).

- Aprendizaje de seguridad. Este concepto ha reaparecido recientemente como otra forma de alivio del miedo. Es similar al re-aprendizaje, sin embargo, no siguen los mismos procesos celulares. Amano *et al.* (2010) observaron que el aprendizaje de seguridad, o inhibición del condicionamiento, produce una potenciación de la transmisión excitatoria procedente de la amígdala basolateral hacia la división lateral de la amígdala que inhibiría las respuestas del miedo, mientras que en el reaprendizaje se produciría un aumento de la transmisión excitatoria entre la amígdala basolateral y las células intercaladas de la amígdala. El aprendizaje de seguridad consistiría en la formación de una memoria inhibitoria que suprimiría la

expresión de la respuesta de miedo no-asociativa, por ejemplo, si el animal asocia un determinado contexto a la ausencia de amenazas.

- Disrupción de la reconsolidación o desconsolidación. Se sabe que la evocación continuada de una memoria aversiva puede hacer que ésta se vuelva una memoria frágil y por tanto difícil de reconsolidar (Nader, 2003). Esta característica ofrecería la oportunidad de intervenir en los procesos de reconsolidación, mediante métodos farmacológicos, eléctricos o conductuales, para producir así una reducción de las respuestas de miedo.

Como ya ha sido citado anteriormente, la CBT es el mejor tratamiento psicológico que existe para los trastornos de la ansiedad, y dentro de la CBT, el componente más importante es la terapia de exposición. Sin embargo, los individuos que padecen fobias, trastornos de pánico o PTSD se caracterizan por evitar situaciones que produzcan una respuesta de miedo lo que imposibilita en gran medida su tratamiento mediante esta técnica psiquiátrica (Otto *et al.*, 2004). En los últimos años, los procesos de extinción han atraído considerable atracción ya que representan un modelo animal válido para el estudio de los procesos biológicos que subyacen a las terapias de exposición presentes en la CBT para el tratamiento de los trastornos de ansiedad (Riebe *et al.*, 2012; Graham y Milad, 2011; Kapland, 2011). Así, se ha observado que existen numerosos compuestos, endógenos y exógenos que son capaces de modular la extinción del miedo tanto en seres humanos como en roedores [ver para mayor información Andero y Ressler (2012)]:

- Antidepresivos. Son el tratamiento farmacológico por excelencia para el PTSD, con todo, existen pocos estudios clínicos que combinen los antidepresivos con una terapia de exposición (Choi *et al.*, 2010; Hetrick *et al.*, 2010) lo que impide apoyar o refutar un incremento de la efectividad del tratamiento combinado. Existen, sin embargo, datos preclínicos que describen la efectividad de la combinación de ambos tratamientos. Así, Karpova *et al.* (2011) observaron que ratones macho, expuestos a un protocolo de extinción y a un tratamiento crónico con fluoxetina exhibieron una disminución persistente de la respuesta de miedo, efecto que no se repetía cuando los animales fueron tratados con cada uno de los tratamientos por separado.

- Inhibidores de las histona-deacetilasas. La actividad de estos inhibidores parecen mejorar los procesos de aprendizaje emocional (Maddox y Schafe, 2011; Bredy y Barad, 2008) a través de la formación de nuevas sinapsis (Fischer *et al.*, 2007). Asimismo, se ha descrito que el uso de compuestos como el ácido valproico, la tricostatina A o el butirato de sodio parecen incrementar la extinción de memorias aversivas tras un condicionamiento contextual cuando son inyectados tanto sistémica como intrahipocampalmente (Bredy y Barad, 2008; Bredy *et al.*, 2007; Lattal *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio realizado por Maddox y Schafe (2011) se observó que la infusión de tricostatina A en la amígdala lateral promovía la consolidación de memorias aversivas tras un condicionamiento de señal. Estos resultados hacen pensar en la necesidad de un mayor número de estudios que permitan elucidar los cambios epigenéticos que el uso de inhibidores de las histona-acetiladas provocan en estructuras implicadas en el procesamiento emocional.
- BDNF y agonistas del receptor TrkB. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*) es una de las neurotrofinas más estudiadas en los procesos de plasticidad sináptica. Heldt *et al.* (2007) observaron que ratones *knock-out* condicionales, con una delección del gen para el BDNF en el hipocampo exhibían déficits en la extinción tras un condicionamiento de señal, por lo que el BDNF podría cumplir una función importante en los procesos de extinción de miedo (Andero y Ressler, 2012). Apoyando esta teoría, se ha observado que la administración de BDNF recombinante en el córtex infralímbico de ratas produjo un incremento de la extinción tras un condicionamiento de señal, incluso sin necesidad de exponer a los animales a un protocolo de extinción (Peters *et al.*, 2010). Por otro lado, la 7,8-dihidroxiavona es un agonista del receptor TrkB, cuyos ligandos endógenos son neurotrofinas. Se ha observado que la administración de una sola dosis sistémica de esta flavona provocó una activación de los receptores TrkB expresados en la amígdala y causó, durante el condicionamiento de los animales, una mejor adquisición de la memoria aversiva, y durante la extinción, un aumento del alivio sintomático del miedo (Andero *et al.*, 2011). A pesar de todo, todavía no se conocen a fondo los efectos que la administración de estos compuestos, i.e. BDNF recombinante y

agonistas del receptor TrkB, en las diferentes regiones cerebrales que componen la matriz del miedo podrían tener sobre la respuesta de miedo

- D-cicloserina. Este antibiótico induce un aumento de la neurotransmisión excitatoria a través de receptores NMDA. Se ha visto que cuando se inyecta sistémicamente o cuando se administra directamente a la amígdala basolateral facilita la consolidación de la extinción de miedo en diversos trastornos de la ansiedad (Otto *et al.*, 2010; Guastella *et al.*, 2008; Kushner *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2006; Ressler *et al.*, 2004), y es especialmente efectiva en pacientes con un miedo maladaptativo y en roedores sometidos a un estrés previo (Myers *et al.*, 2011).
- Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). A pesar de que se necesitan más estudios que nos permitan explorar en mayor profundidad la regulación que ejerce el eje HHA sobre los procesos de extinción de miedo, es cierto que existe cierta relación entre el conocido como eje del estrés y la matriz del miedo. Por ejemplo, se sabe que la amígdala es una estructura cerebral imprescindible para el condicionamiento de miedo y para la regulación del eje HHA. Por otro lado, un tratamiento crónico con dosis elevadas de corticosterona provoca en ratas macho una alteración de la extinción de miedo tras un condicionamiento contextual (Gourley *et al.*, 2009).
- Sistema endocannabinoide (SEC). Existen diversas evidencias que indican que el SEC está específicamente implicado, a través de los receptores CB1, en la extinción de conductas que permiten al individuo evitar un estímulo aversivo [ver revisiones de Trezza y Campolongo (2013), Riebe *et al.* (2012) y Ruehle *et al.* (2011)]. La modulación que ejerce el SEC sobre la extinción de memorias aversivas ha sido previamente descrita en el segundo apartado de la Introducción de la presente Tesis Doctoral.

En el Bloque III de la presente Tesis Doctoral utilizamos un protocolo de condicionamiento de señal modificado para crear una memoria altamente aversiva (mediante el uso de un *shock* eléctrico de 1.5 mA) y posteriormente expusimos a los animales a un protocolo de extinción en el que el EC (i.e. un tono) fue presentado de manera continuada (durante 3 minutos) a lo largo de tres días consecutivos para así conseguir una respuesta de miedo sostenida a lo largo del tiempo y poder utilizar diversos fármacos moduladores de la actividad del SEC, con un protocolo de

administración tanto agudo como repetido, para comprobar la implicación de este sistema en los procesos de extinción de memorias altamente aversivas.

4.3. Extinción de memorias y adicción a drogas

Intervenciones clínicas que inhiben respuestas de miedo en los trastornos de ansiedad se han revelado efectivas también para la reducción de la ansiedad que aparece en individuos adictos a una droga de abuso cuando no pueden acceder a ésta, así como para reducir el número de recaídas (Kaplan *et al.*, 2011).

En este contexto, la memoria asociada al consumo de la droga se formaría a través de un condicionamiento Pavloviano clásico, tanto de señal como de contexto, en el que el individuo asociaría los efectos reforzantes de la droga de abuso con EC tales como por ejemplo personas, objetos propios del consumo de la droga, dinero o lugares específicos (O'Brien *et al.*, 1993). De esta manera, la exposición a uno de estos EC, tanto contextuales como de señal, promovería el consumo de la droga y por tanto la recaída en su consumo (Crombag *et al.*, 2008; See *et al.*, 2002). Por tanto, tendría sentido que los procesos de extinción pudieran ser efectivos para reducir la sintomatología adictiva en presencia de estos EC y pudieran promover la recuperación de la adicción a una droga de abuso.

En investigación nos encontramos con modelos animales establecidos para comprobar los efectos adictivos de una droga de abuso cuyas bases se asientan en el condicionamiento Pavloviano. Por ejemplo el test de la preferencia condicionada de lugar (CPP, del inglés *Conditioned place preference*) en el que un compartimento con un contexto definido se empareja con la administración de la droga. Tras varios emparejamientos el animal termina prefiriendo el compartimento con el contexto en donde recibió la droga (Aguilar *et al.*, 2009; Tzschentke, 1998). Asimismo, antes de comenzar un experimento de autoadministración, los animales deben aprender a administrarse la droga, lo cual logran mediante un condicionamiento operante, en el que una acción (por ejemplo empujar una palanca) se empareja con una recompensa (comida).

En los últimos años han surgido un gran número de trabajos que han demostrado la eficacia de tratamientos farmacológicos y conductuales para incrementar la extinción no sólo de memorias aversivas sino también de memorias asociadas al consumo de drogas de abuso (Kaplan *et al.*, 2011). También se ha observado que fármacos que facilitan la extinción son eficaces para el tratamiento de las drogodependencias. Así, por ejemplo, se ha visto que la D-cicloserina es un agente eficaz para atenuar las ganas de fumar en personas dependientes de la nicotina (Santa Ana *et al.*, 2009) y que el butirato de sodio, un inhibidor de las histona-deacetilasas, facilitó la extinción del condicionamiento de lugar provocado por cocaína en ratones (Malvaez *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Consideraciones preliminares

El consumo de drogas es prevalente entre adolescentes que tienen una patología psiquiátrica que precisa ingreso hospitalario y son numerosos los autores que relacionan el consumo de drogas y la patología psiquiátrica en la adolescencia. Se sabe que las propias sustancias tanto durante la intoxicación como durante la abstinencia pueden generar determinadas alteraciones de la conducta y síntomas psiquiátricos pero, además, es muy posible que determinados trastornos psiquiátricos y los relacionados con el consumo compartan bases neurobiológicas y/o que existan factores comunes en su desencadenamiento y desarrollo (factores genéticos, trastornos en la infancia, estrés, etc). **En los períodos críticos perinatal y adolescente el cerebro, que se encuentra en plena fase de desarrollo, muestra una especial vulnerabilidad en relación tanto a factores estresantes como a los efectos de las drogas de abuso y a la aparición de trastornos psiquiátricos.** En particular, la esquizofrenia suele mostrar sus primeros síntomas en edad juvenil/adulto joven. Es destacable el consumo de drogas en pacientes con esquizofrenia que para algunos autores alcanza hasta el 60%. **El cannabis (marihuana, hachis), la MDMA (éxtasis) y la cocaína, son las drogas ilícitas más ampliamente consumidas hoy en día y en ellas nos hemos centrado en este proyecto.**

Para los dos primeros objetivos generales de esta Tesis Doctoral, hemos utilizado dos modelos animales con el fin de estudiar 1) las interacciones entre el estrés en edades tempranas, edad neonatal concretamente, y consumo de drogas en etapa juvenil y sus relaciones con desórdenes neuropsiquiátricos, incluida la adicción y 2) el impacto a largo plazo del consumo combinado de cannabis y MDMA en edad adolescente.

Dos “temas” centrales de esta Tesis Doctoral, que recorren transversalmente los diversos objetivos son el **sistema endocannabinoide** y los **dimorfismos sexuales**.

En cuanto al tercer y último objetivo general de esta Tesis Doctoral, constituye la aportación específica para la obtención de Doctorado Europeo y el correspondiente trabajo experimental se realizó durante dos estancias (un total de 12 meses) del doctorando en el laboratorio del Dr Carsten T. Wotjak en el Instituto Max Planck de Psiquiatría en Munich. En particular, en el citado laboratorio se realizan estudios sobre la extinción de un miedo exagerado mediante técnicas de reexposición, y la implicación

del SEC en tales procesos. **El trastorno por estrés postraumático es una enfermedad grave con efectos psiquiátricos a largo plazo que se desarrolla tras haber sufrido uno o varios eventos que potencialmente ponen en riesgo la vida del individuo.** Uno de los síntomas más importantes y que dificultan su tratamiento, a través de una terapia de exposición, es la evitación de estímulos asociados con el trauma, que impiden al individuo seguir con su vida normal. En la actualidad, se sabe que **existe una relación entre el SEC y el procesamiento de memorias aversivas.** Sin embargo, los modelos animales de extinción del miedo presentan una importante limitación, como es la imposibilidad de testar tratamientos crónicos. Así pues, en el tercer bloque de la presente Tesis Doctoral nos fijamos como objetivo 3) la caracterización de un modelo animal de condicionamiento de miedo en el que la respuesta de *freezing*, o respuesta conductual asociada al miedo, no decreciera tras varios días de extinción, y por otro lado conocer la implicación del SEC en la extinción de memorias altamente aversivas.

1.PRIMER OBJETIVO GENERAL (modelo de los dos impactos)

Nuestro primer objetivo general se sitúa en el contexto de la teoría de los dos impactos (*two hits*), Según nuestra hipótesis, el modelo de separación materna (SM) temprana [24 horas a día postnatal (DP) 9], al que nos hemos referido en detalle en la Introducción, y sobre el que nuestro grupo viene trabajando extensamente en los últimos años, representa un factor ambiental de vulnerabilidad que actúa sobre una base genética (cepa *Wistar*). Sobre estos individuos vulnerables, esperamos que los tratamientos con cannabinoides, cocaína o 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) induzcan efectos más marcados que en sujetos no vulnerables (no sometidos a SM) sobre diversos parámetros psiconeuroendocrinos. Nuestro objetivo general es, para poner a prueba esta hipótesis, analizar la posible interacción entre un estrés de SM temprana, (primer factor de impacto que hace al individuo más vulnerable), y la administración crónica de un agonista cannabinoide, cocaína o MDMA en etapa juvenil (segundo factor de impacto).

Dentro de este primer objetivo general, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1.1. CONSECUENCIAS, A LARGO PLAZO, DE LA EXPOSICIÓN DE RATAS MACHO Y HEMBRA A SEPARACIÓN MATERNA NEONATAL Y/O A UN AGONISTA CANNABINOIDE EN EDAD JUVENIL

Analizar la posible interacción entre la SM (primer impacto) y la exposición adolescente a un agonista cannabinoide, CP-55,940 (CP) (segundo impacto), examinando los efectos a largo plazo de estos dos tratamientos a diferentes niveles de la fisiología y el comportamiento de los individuos sujetos de nuestro estudio. Esperábamos que la combinación de ambos desafíos en etapas críticas del desarrollo pudiera dar lugar a efectos aditivos o incluso de potenciación. En todos los experimentos se han considerado animales machos y hembras por separado dado que, de acuerdo con nuestra experiencia previa, tanto la SM como los tratamientos con agonistas cannabinoides en periodo adolescente producen alteraciones distintas dependiendo del sexo. Con el fin de poner a prueba nuestra hipótesis hemos estudiado una serie de parámetros que nos proporcionaran un cuadro diverso de posibles alteraciones psicofisiológicas, así como posibles correlatos a nivel de alteraciones cerebrales mediante análisis inmunohistoquímico (véase debajo).

- Inhibición prepulso (PPI) de la respuesta de sobresalto.
- Actividad locomotora y exploratoria en el tablero con agujeros (TCA).
- Respuestas relacionadas con ansiedad en el laberinto en cruz elevado (LCE).
- Función del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HHA) en respuesta a situaciones de estrés
- Evolución del peso corporal y valoración de los niveles séricos de leptina en relación con el papel de esta hormona en el control del balance energético.
- Análisis inmunohistoquímico, atendiendo a los siguientes parámetros: receptores cannabinoides CB1, células positivas para la proteína fibrilar ácida de la glía

(GFAP; del inglés *glial fibrillary acidic protein*) y expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) en el hipocampo de los mismos animales

1.2. LA SEPARACIÓN MATERNA EN RATAS NEONATALES AFECTA AL CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR INDUCIDO POR MDMA DE FORMA DEPENDIENTE DEL SEXO. POSIBLES CORRELATOS NEUROQUÍMICOS.

Evaluar hasta qué punto el estrés neonatal de separación de la madre podría afectar la proclividad al consumo de MDMA. Para este fin utilizamos el modelo de preferencia condicionada de lugar (CPP, del inglés *Conditioned place preference*) que representa un abordaje válido para valorar los efectos reforzantes de diferentes tipos de drogas de abuso. Para el estudio de posibles correlatos neuroquímicos, analizamos tanto el sistema serotoninérgico como el receptor CB1, además, también medimos niveles de leptina y corticosterona dado que ambas hormonas se ven afectadas tanto por la SM como por la MDMA (cuando se administran por separado)

1.3. EFECTOS A LARGO PLAZO, SEXO-DEPENDIENTES, DE LA SEPARACIÓN MATERNA Y/O UN TRATAMIENTO JUVENIL CON COCAÍNA SOBRE RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 CEREBRALES Y CB2 PERIFÉRICOS

La cocaína es una de las drogas ilícitas más consumidas en Europa, y es normalmente consumida por adolescentes, y el sistema endocannabinoide (SEC) está crucialmente implicado en procesos relacionados con la adicción. En el presente estudio hemos investigado los efectos a largo plazo de la administración adolescente de cocaína y/o la SM sobre la densidad y actividad de receptores CB1 en diversas áreas cerebrales. Además, teniendo en cuenta la comorbilidad de las drogas de abuso con numerosas enfermedades infecciosas y el papel clave que juega el SEC en la función inmune, se evaluaron también los receptores CB2 en tejidos del sistema inmunitario.

2.SEGUNDO OBJETIVO GENERAL (modelo de exposición combinada a cannabis y éxtasis durante el período periadolescente)

EFFECTOS A LARGO PLAZO DEL THC Y LA MDMA EN UN MODELO EN RATA DE CONSUMO ADOLESCENTE DE DROGAS

El éxtasis es una droga recreacional ampliamente utilizada y que suele consumirse junto al cannabis. A pesar de que estas drogas ilícitas son empleadas frecuentemente por adolescentes, muy pocos estudios animales han analizado su interacción durante la adolescencia. El segundo objetivo general de esta Tesis consistió en estudiar las consecuencias fisiológicas y conductuales de la administración en ratas *Wistar*, tanto machos como hembras, durante el período adolescente, del principal componente psicoactivo del cannabis, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y de éxtasis (MDMA). Se estableció un protocolo de administración que mimetizara el patrón de consumo en humanos, a saber, THC crónico con dosis crecientes desde la adolescencia temprana, seguido de un consumo de "fin de semana" de MDMA. Los animales realizaron las pruebas del TCA y del LCE un día después de haber terminado el tratamiento farmacológico (animales aún adolescentes), mientras que la prueba de reconocimiento de objetos (NOT; del inglés *novel object recognition*) y la de inhibición prepulso (PPI) de la respuesta de sobresalto se realizaron en la etapa adulta. Además se evaluó por *Western blot* la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (pERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinases*) y la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc; del inglés *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) en el hipocampo y el córtex prefrontal. Asimismo, se analizaron los niveles de ARNm hipotalámicos de prepro-orexina y se determinaron los niveles circulantes de corticosterona y leptina. Además, nos propusimos hacer un estudio inmunohistoquímico sobre áreas cerebrales discretas de estos animales con el fin de evaluar el impacto de los tratamientos sobre el transportador de serotonina (SERT), el receptor CB1 cannabinoide y células de glía (astrocitos y microglía).

Análisis transversal de diferencias sexuales

Tanto en relación con desórdenes neuropsiquiátricos como en lo que respecta al abuso de drogas, se observan con mucha frecuencia diferencias sexuales. Sin embargo la atención que reciben estas diferencias tanto en estudios en humanos como en estudios experimentales es todavía insuficiente. Nuestro grupo de investigación se ha caracterizado desde hace muchos años por hacer un especial hincapié en los dimorfismos sexuales y su base neurobiológica. En este proyecto, hemos evaluado el efecto del sexo en todos los experimentos correspondientes a los dos primeros objetivos generales.

3. TERCER OBJETIVO GENERAL (modelo animal de miedo extremo e implicación del SEC)

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN UN MODELO ANIMAL DE MIEDO EXTREMO. EFECTOS OPUESTOS DE LA ANANDAMIDA Y DEL 2-AG

Caracterizar un modelo animal de miedo extremo en el que un periodo de extinción consistente en 3 días consecutivos de exposición al estímulo condicionado (EC) no indujese una disminución significativa de la respuesta de *freezing*. Una segunda fase de este objetivo consistió en aplicar sobre este modelo tratamientos crónicos, administrados antes de cada test de extinción del miedo, cuya función fuese la de actuar sobre los diversos componentes del SEC para poder así conocer su implicación en la consolidación y extinción del miedo. Entre los fármacos cannabinoides que se emplearon se encuentran agonistas y antagonistas de los receptores CB1, CB2 y de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1, del inglés *Transient receptor potential vanilloid 1*), así como potenciadores de la señal endocannabinoide a través de inhibidores del transportador o inhibidores de la degradación de los endocannabinoides. Asimismo, se emplearon ratones *knock-out* condicionales Nex y Dlx, que presentan una

deleción del receptor CB1 a nivel de los terminales glutamatérgicos y GABAérgicos respectivamente, para profundizar en los sistemas de neurotransmisión a través de los cuales el SEC contribuye a la regulación del aprendizaje de memorias aversivas.

BLOQUE I

Consecuencias, a largo plazo, de la exposición de ratas macho y hembra a separación materna neonatal y/o a un agonista cannabinoide en edad juvenil

Análisis conductual y endocrino

Diversas evidencias indican que experiencias traumáticas durante periodos tempranos del desarrollo podrían estar asociadas a la aparición de psicopatologías (como por ejemplo la depresión o la esquizofrenia) y a una función neuroendocrina alterada en etapas posteriores de la vida (Levine, 2005; Moffett *et al.*, 2007; Tyrka *et al.*, 2008). Entre los modelos experimentales utilizados para el estudio de experiencias estresantes en edades tempranas, uno de los más empleados es la separación materna (SM) neonatal en roedores, que suele aplicarse, de forma general, o bien en periodos relativamente cortos durante varios días consecutivos o bien mediante un solo episodio de separación durante 24 horas. Es relevante mencionar, que este modelo de estrés neonatal suele aplicarse durante el periodo de hiporreactividad al estrés (SHRP, del inglés *Stress hyporesponsive period*), que se prolonga durante los días postnatales (DP) 4-14, y se caracteriza por una reducida respuesta adrenocortical a factores estresantes (Levine, 2001, Marco *et al.*, 2009). Estos tratamientos parecen ser herramientas útiles para investigar el impacto del estrés en periodos tempranos del desarrollo sobre diversos parámetros tanto conductuales como neuroendocrinos. Cabe destacar que ratas adultas sometidas a un episodio de SM de 24 horas a DP 9 mostraron anomalías conductuales que se asemejan a signos de tipo psicótico, incluyendo alteraciones de la inhibición prepulso (PPI, del inglés *prepulse inhibition*) de la respuesta de sobresalto, la inhibición latente, el filtrado sensorial auditivo y la habituación a la respuesta de sobresalto [ver revisión de (Elenbroek *et al.*, 2004)]. Se ha relacionado la alteración de la PPI con el déficit de filtrado sensomotor y los procesos atencionales presentes en la esquizofrenia (Van den Buuse *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2001; Weiss y Feldon, 2001). En estos animales también se observaron, en edad adulta, una disminución de los niveles hipocámpales de: neuropéptido Y (NPY), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM, del inglés *Neural*

cellular adhesion molecule) polisializada y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) así como una disminución de las subunidades NR-2A y NR-2B del receptor NMDA [ver para revisión (Ellenbroek y Riva, 2003; Ellenbroek *et al.*, 2004)]. Además, en nuestro grupo de investigación hemos demostrado que, durante la adolescencia, ratas sometidas a este mismo tratamiento de SM mostraron un comportamiento de tipo depresivo y respuestas alteradas a un agonista cannabinoide (Llorente *et al.*, 2007) y una tendencia a una mayor impulsividad (Marco *et al.*, 2007a). En estudios realizados para analizar posibles alteraciones en el desarrollo del cerebro de estos animales, también hemos demostrado que la SM ocasionó un aumento de neuronas en proceso de degeneración y un aumento del número de células inmunorreactivas a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*) en el hipocampo y la corteza cerebelosa de ratas neonatales, efectos que, en general, fueron más marcados en machos que en hembras. Más aún, la SM también causó una disminución duradera de los niveles circulantes de leptina y un aumento de la corticosterona en ambos sexos (López-Gallardo *et al.*, 2008; Llorente *et al.*, 2008; 2009; Viveros *et al.*, 2009). Estas alteraciones apoyan nuestra hipótesis de que el estrés neonatal que supone la SM podría ser un modelo útil para examinar síntomas conductuales con una etiología en el neurodesarrollo.

La adolescencia representa una fase crítica en el desarrollo durante la cual el sistema nervioso muestra una plasticidad única. Durante este periodo todavía están teniendo lugar la maduración y la nueva disposición de las principales vías de neurotransmisión (Spear, 2000; Romeo, 2003; Laviola y Marco, 2011), incluyendo el sistema endocannabinoide (SEC) (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993; Viveros *et al.*, 2012a, 2012b). Se considera que la adolescencia transcurre entre aproximadamente los 12 y 20-25 años en humanos y alrededor de los DP 28-42 en roedores (Spear, 2000; Adriani y Laviola, 2004). El periodo adolescente ha sido identificado como una fase del desarrollo particularmente vulnerable a los efectos adversos de la exposición a cannabis. De manera notable, en personas predispuestas, la exposición temprana al cannabis incrementa el riesgo de desarrollar esquizofrenia y puede exacerbar síntomas en pacientes psicóticos (Di Forti *et al.*, 2007; Leweke y Koethe, 2008; Fernández-Espejo *et al.*, 2009; Sewell *et al.*, 2009). Además, estudios tanto en humanos como en animales indican que el uso de cannabis durante la adolescencia, puede producir efectos

adicionales negativos como alteraciones cognitivas, sintomatología depresiva y un aumento del riesgo a desarrollar más tarde trastornos relacionados con el abuso de sustancias. Es más, diversos resultados apuntan a dimorfismos sexuales en la forma de presentarse ciertos efectos (Sundram, 2006; Biscaia *et al.*, 2008; Higuera-Matas *et al.*, 2008; Rubino *et al.*, 2008; Schneider, 2008; Fernández-Espejo *et al.*, 2009; Wegener y Koch, 2009; Viveros *et al.*, 2012a; 2012b; Craft *et al.*, 2012).

El periodo periadolescente también parece ser crítico para el desarrollo de los receptores CB1 y los niveles de endocannabinoides (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993; Wenger *et al.*, 2002, Marco *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2011), y el SEC juega un papel prominente en la homeostasis emocional (Viveros *et al.*, 2007a; 2007b; Marco y Viveros, 2009). Por tanto, es concebible que una interferencia crónica por parte de cannabinoides exógenos en el SEC en desarrollo durante este periodo crítico pueda producir alteraciones funcionales severas y persistentes (Schneider y Koch, 2007). De hecho, hay evidencias sustanciales que indican que la exposición a diversos agonistas cannabinoides durante el periodo adolescente ejerce efectos deletéreos a largo plazo en la edad adulta en relación a la atención, la memoria, la ansiedad, la conducta afectiva y la susceptibilidad a la adicción. Por ejemplo, en ratas macho, la exposición crónica a Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) durante la adolescencia, disminuyó la conducta social y la memoria de reconocimiento de objetos (Quinn *et al.*, 2008), mientras que aumentó la autoadministración de heroína (Ellgren *et al.*, 2007). La exposición de ratas macho al agonista cannabinoide WIN55212-2 aumentó el comportamiento de tipo depresivo en las pruebas de natación forzada y preferencia por sacarosa y favoreció conductas de tipo ansiogénico en la prueba de alimentación suprimida por la novedad (Bambico *et al.*, 2010), alteró la memoria de reconocimiento (Wegener y Koch, 2009; Schneider *et al.*, 2005; Schneider y Koch, 2003) y redujo el juego social y la conducta social (Schneider y Koch, 2005). De acuerdo con todo lo anterior, el tratamiento adolescente con el agonista cannabinoide CP-55,940 (CP) ocasionó una alteración de la memoria de reconocimiento de objetos y la conducta social en ratas adultas tanto macho (O'Shea *et al.*, 2006) como hembra (O'Shea *et al.*, 2004). Sin embargo, existen pocos estudios que comparen directamente ambos sexos. En ciertos trabajos anteriores de nuestro grupo y de otros autores, que incluyen ambos sexos, se observó que la administración crónica de CP (0,4 mg/kg) en la adolescencia causó efectos sexo-dependientes a largo plazo sobre

la actividad/exploración y las respuestas de ansiedad en ambientes nuevos (Biscaia *et al.*, 2003), así como en la autoadministración de morfina y cocaína (Biscaia *et al.*, 2008; Higuera-Matas *et al.*, 2008). Asimismo, encontramos que la exposición adolescente a la misma dosis de CP causó en hembras una alteración de la memoria espacial en el test conductual de localización de objetos, mientras que en los machos produjo una disminución del tiempo de exploración del objeto nuevo en la prueba de reconocimiento de objetos (NOT, del inglés *Novel object test*; Mateos *et al.*, 2011). Rubino *et al.* (2008) en un estudio sobre el impacto a largo plazo de administración crónica de THC en ratas adolescentes observaron que, en hembras, la exposición al THC ocasionó, en edad adulta, un aumento del tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada (que se considera como un índice de comportamiento de tipo depresivo), y una disminución de la preferencia por la sacarosa (indicativa de anhedonia), así como alteraciones bioquímicas (activación de CREB) en córtex frontal, hipocampo y núcleo accumbens, mientras que en machos sólo se observó anhedonia en el test de preferencia a sacarosa, datos que indican efectos sexo-dependientes del tratamiento con el agonista cannabinoide. Recordemos, además, que hemos encontrado también numerosos efectos celulares y bioquímicos sexo-dependientes de la SM (Llorente *et al.*, 2007; 2008; 2009; López-Gallardo *et al.*, 2008), incluyendo una desregulación sexo-dependiente del SEC [Suárez *et al.*, 2009; 2010; ver revisiones de Viveros *et al.*, (2009) y (2012a)].

A pesar de que se ha demostrado que ambos, la SM y un tratamiento cannabinoide durante la adolescencia, por separado, producen importantes efectos conductuales y neuroendocrinos a largo plazo, cabe pensar que la combinación de los dos tratamientos pudiera tener un mayor impacto que cada uno de ellos por separado. Al hilo de esta reflexión, Maynard *et al.* (2001) desarrolló la hipótesis del “doble impacto” de la esquizofrenia que puede ser aplicado a otras psicopatologías. De acuerdo con esta teoría, el normal neurodesarrollo temprano podría verse alterado por factores ambientales y/o genéticos (“primer impacto”), lo que podría llevar a un aumento a largo plazo de la vulnerabilidad a un “segundo impacto” (que podría consistir por ejemplo en exposición a estrés o drogas en edades posteriores de la vida). En este marco, estudios previos han analizado la interacción de la SM y el estrés en adultos jóvenes (Garner *et al.*, 2007; Choy *et al.*, 2008; 2009). En el presente estudio, quisimos abordar la posible interacción entre el estrés de la SM (“primer impacto”) y la exposición adolescente a un

agonista cannabinoide (“segundo impacto”). En particular, hemos investigado los efectos a largo plazo de la SM y/o un tratamiento crónico adolescente con el agonista cannabinoide CP sobre los siguientes parámetros:

1. la PPI, como medida de la capacidad de atención.
2. el comportamiento en el tablero con agujeros (TCA), como una medida de exploración dirigida a estímulos y actividad motora
3. el comportamiento en laberinto en cruz elevado (LCE), para evaluar respuestas de ansiedad y comportamientos de riesgo
4. la función del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) en condiciones basales y en respuesta a un estrés moderado
5. la ganancia de peso y los niveles de leptina.

En todos los experimentos hemos analizado la posible existencia de diferencias sexuales. Además, evaluamos el comportamiento materno para detectar posibles efectos de la SM sobre la madre

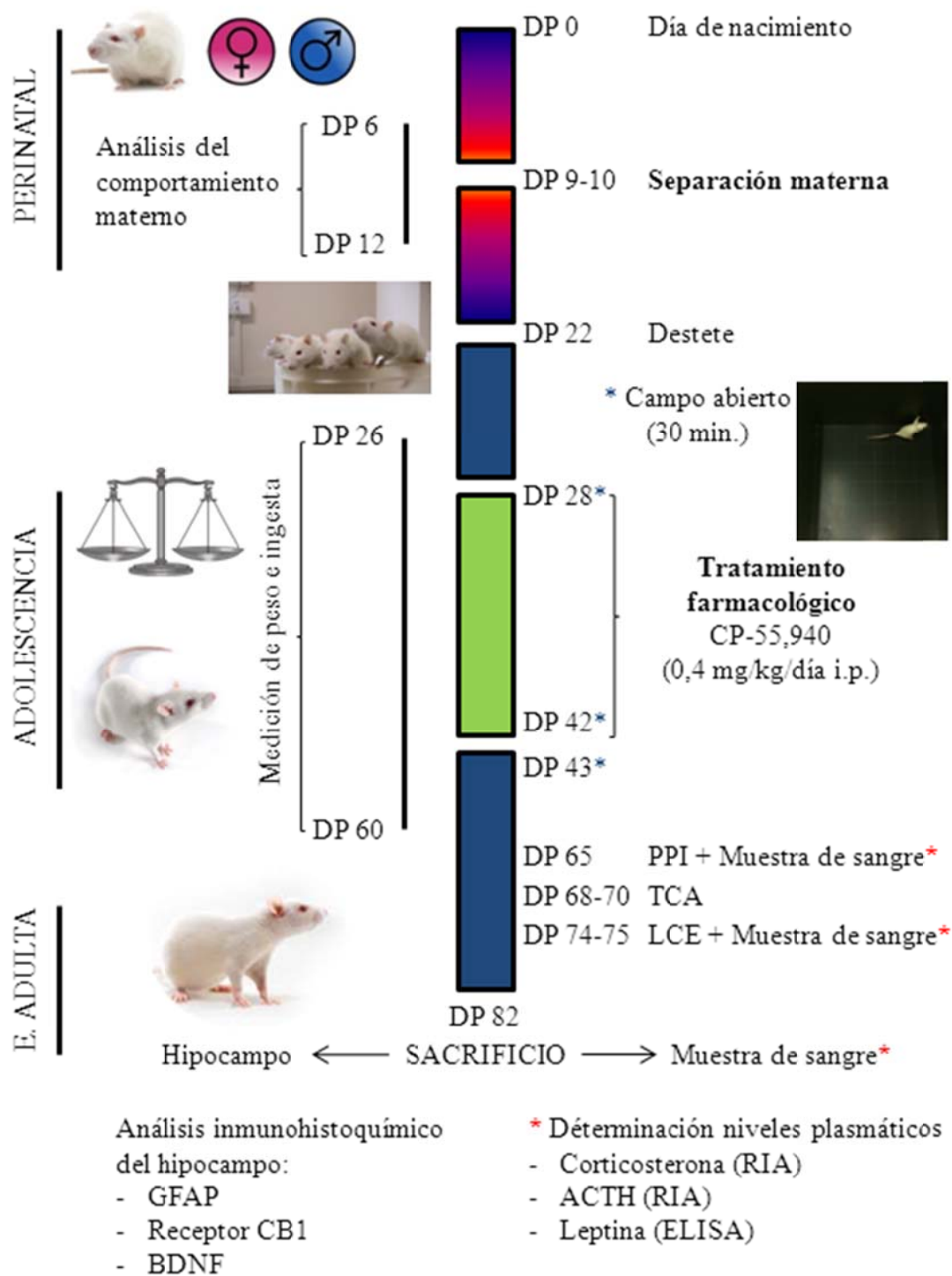
Análisis Inmunohistoquímico

El estudio conductual y endocrino descrito en la sección 1.1 de este primer capítulo constituye, hasta lo que conocemos, la primera aproximación experimental al análisis de los efectos psicofisiológicos a largo plazo de la combinación de nuestro modelo de SM y la exposición adolescente a CP en ratas de ambos sexos. En este siguiente trabajo, analizamos, en los cerebros de los mismos animales utilizados en el primer estudio, los receptores cannabinoideos CB1, las células GFAP+ y la expresión de BDNF en hipocampo (López-Gallardo *et al.*, 2012). A continuación exponemos brevemente qué nos llevó a elegir estos parámetros y esta región cerebral.

El grupo de Ellenbroek había descrito cambios inducidos por la SM en la expresión del BDNF hipocampal (Ellenbroek y Riva, 2003; Ellenbroek *et al.*, 2004) una molécula que nos interesó particularmente por su implicación en regular la supervivencia celular y la diferenciación. En estudios previos habíamos demostrado claramente que la SM altera el SEC en desarrollo. Así, los animales SM neonatales

tenían un incremento de los niveles de 2-AG (2-araquidonilglicerol) y una disminución de la inmunorreactividad de CB1 en el hipocampo, siendo estas alteraciones más marcadas en machos (Llorente *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2009). Además, la SM también disminuyó significativamente la monoacilglicerol lipasa (MAGL) hipocampal, la enzima más importante encargada de la degradación de 2-AG, como se refleja por RT-PCR e inmunohistoquímica. Esta disminución, de nuevo, fue más marcada en machos que en hembras (Suárez *et al.*, 2010). Es más, dos inhibidores de la inactivación de los endocannabinoides modularon los efectos celulares producidos por el estrés de la SM anteriormente citados (Llorente *et al.*, 2007). En conjunto, estos datos apuntan a una clara asociación entre el estrés producido por la SM y la desregulación del SEC. También habíamos descrito que la SM provocó un rápido cambio en el número de células GFAP+ además de en los receptores CB1 en el hipocampo de ratas neonatales (DP 13) (Llorente *et al.*, 2008; 2009). Con este trabajo pretendimos investigar si estas alteraciones persisten en la edad adulta. Además, previamente habíamos informado de que el tratamiento con el agonista cannabinoide CP, a una dosis de 0.4 mg/kg/día (DP 28-43), causó a largo plazo, efectos perjudiciales sexo-dependientes sobre la memoria, así como cambios en los receptores CB1 de las áreas CA1 y CA2 del hipocampo (Mateos *et al.*, 2011). Como se ha indicado en la Introducción general, el hipocampo es una de las regiones cerebrales que muestra una mayor expresión de receptor CB1 (Herkenham *et al.*, 1990), la administración intrahipocampal de compuestos cannabinoides produce alteraciones en la memoria (Lichtman *et al.*, 1995), y los cannabinoides desincronizan el montaje neuronal en el hipocampo, lo que posiblemente ocasione las alteraciones en la memoria observadas (Robbe *et al.*, 2006). Además, se han reportado cambios morfológicos en el hipocampo tras una administración crónica de cannabinoides (Lawston *et al.*, 2000; Tagliaferro *et al.*, 2006).

DISEÑO EXPERIMENTAL:



Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour

Alvaro Llorente-Berzal¹, Sílvia Fuentes^{2,3}, Humberto Gagliano^{2,3}, Meritxell López-Gallardo¹, Antonio Armario^{2,3}, María-Paz Viveros¹ & Roser Nadal^{2,4}

Department of Physiology (Animal Physiology II), School of Biological Sciences, Complutense University, Madrid, Spain¹, Institute of Neurosciences, Autonomous University of Barcelona, Spain², Animal Physiology (School of Biosciences), Autonomous University of Barcelona, Spain³ and Psychobiology (School of Psychology), Autonomous University of Barcelona, Spain⁴

ABSTRACT

Early life experiences such as maternal deprivation (MD) exert long-lasting changes in adult behaviour and reactivity to stressors. Adolescent exposure to cannabinoids is a predisposing factor in developing certain psychiatric disorders. Therefore, the combination of the two factors could exacerbate the negative consequences of each factor when evaluated at adulthood. The objective of this study was to investigate the long-term effects of early MD [24 hours at postnatal day (PND) 9] and/or an adolescent chronic treatment with the cannabinoid agonist CP-55,940 (0.4 mg/kg, PND 28–42) on diverse behavioural and physiological responses of adult male and female Wistar rats. We tested them in the prepulse inhibition (PPI) of the startle response and analysed their exploratory activity (holeboard) and anxiety (elevated plus maze, EPM). In addition, we evaluated their adrenocortical reactivity in response to stress and plasma leptin levels. Maternal behaviour was measured before and after deprivation. MD induced a transient increase of maternal behaviour on reuniting. In adulthood, maternally deprived males showed anxiolytic-like behaviour (or increased risk-taking behaviour) in the EPM. Adolescent exposure to the cannabinoid agonist induced an impairment of the PPI in females and increased adrenocortical responsiveness to the PPI test in males. Both, MD and adolescent cannabinoid exposure also induced sex-dependent changes in plasma leptin levels and body weights. The present results indicate that early MD and adolescent cannabinoid exposure exerted distinct sex-dependent long-term behavioural and physiological modifications that could predispose to the development of certain neuropsychiatric disorders, though no synergistic effects were found.

Keywords Adolescent cannabinoid exposure, adrenocortical reactivity, leptin levels, long-term behavioural effects, maternal deprivation, sex differences.

Correspondence to: Roser Nadal, Psychobiology (School of Psychology), Autonomous University of Barcelona, Bellaterra 08192, Spain. E-mail: roser.nadal@uab.es; María-Paz Viveros, Department of Physiology (Animal Physiology II), School of Biological Sciences, Complutense University, Madrid 28040, Spain, E-mail: pazviver@bio.ucm.es

INTRODUCTION

Early adverse experiences are now recognized to predispose to several psychopathologies (Heim & Nemeroff 2001; Shea *et al.* 2005; Morgan & Fisher 2007). In particular, parent–child separation prior to adolescence appears to be associated with an increased risk for major depression (Kendler *et al.* 2002) and psychosis (Morgan *et al.* 2007). One of the rodent models to study early negative experiences has been maternal deprivation (MD) for 24 hours during the stress hypo-responsive period, lasting from postnatal days (PNDs) 4–14, and characterized

by a reduced adrenocortical responsiveness to stressors (Levine 2001). A 24-hour single episode of MD, at different time windows during the first 2 weeks of postnatal life, appears to provide a useful model to investigate the impact of early life stress on diverse behavioural and neuroendocrine parameters (Marco *et al.* 2009). Notably, adult rats submitted to a 24-hour episode of MD at PND 9 showed behavioural abnormalities that resemble psychotic-like symptoms, including disturbances in prepulse inhibition (PPI), latent inhibition, auditory sensory gating and startle habituation (see for review Ellenbroek *et al.* 2004). Impairment in PPI has been

related to the deficit in sensorimotor gating and attentional processes presented in schizophrenia (Geyer *et al.* 2001; Weiss & Feldon 2001; Van den Buuse, Garner & Koch 2003). In addition, we have shown that, at adolescence, MD rats showed depressive-like behaviour and altered responses to a cannabinoid agonist (Llorente *et al.* 2007), as well as a trend towards increased impulsivity (Marco *et al.* 2007).

Adolescence represents a critical phase in development during which the nervous system shows a unique plasticity. In rodents, periadolescence has been classically defined as the ontogenetic period that encompasses the 7–10 days preceding the onset of puberty (at 40 days of age) and the first few days thereafter (Spear & Brake 1983). During that period, maturation and rearrangement of major neurotransmitter pathways are still taking place (Spear 2000; Romeo 2003). In general, there are important maturational changes in several brain areas important for cognition, emotion, motivation and reactivity to stress such as the prefrontal cortex and limbic brain structures (see Spear 2000; Ernst, Romeo & Andersen 2009 for a revision). Moreover, a 'window of vulnerability' appears to exist during the periadolescent period regarding the onset of certain neuropsychiatric disorders and vulnerability to addiction (Adriani & Laviola 2004). In predisposed people, early exposure to cannabis increases the risk of developing schizophrenia and may exacerbate symptoms in psychotic patients (Fernández-Espejo *et al.* 2009; Sewell, Ranganathan & D'Souza 2009). In addition, both human and animal studies indicate that cannabis use during adolescence may also produce other negative effects such as cognitive impairment, depressive symptoms and increased risk of further developing substance abuse disorders (Sundram 2006; Schneider 2008; Mateos *et al.* 2010).

The peripubertal period appears to be critical for the development of cannabinoid CB₁-receptors and endocannabinoid levels (Rodríguez de Fonseca *et al.* 1993; Wenger *et al.* 2002), and the endocannabinoid system plays a prominent role in emotional homeostasis (Marco & Viveros 2009). Therefore, it is conceivable that chronic interference of exogenous cannabinoids with the developing endocannabinoid system during this critical period may lead to severe and persistent functional impairments (Schneider & Koch 2007). In fact, there is substantial evidence indicating that exposure to diverse cannabinoid agonists during the adolescent period exerts long-lasting deleterious effects at adulthood in relation to attention, memory, anxiety, affective behaviour and susceptibility to addiction. For instance, adolescent exposure of male rats to chronic delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), decreased social behaviour and object recognition memory (Quinn *et al.* 2008), while enhancing heroin self-administration (Ellgren, Spano & Hurd 2007).

Similarly, exposure of male rats to the cannabinoid agonist WIN55,212-2 increased depressive-like behaviour in the forced swim and sucrose preference tests, favoured anxiogenic-like behaviours in the novelty-suppressed feeding task (Bambico *et al.* 2010), impaired recognition memory (Schneider & Koch 2003, 2007; Schneider, Schomig & Leweke 2008) and PPI (Schneider & Koch 2003; Schneider, Drews & Koch 2005; Wegener & Koch 2009), and reduced social play and social behaviour (Schneider & Koch 2005).

In accordance with the above data, adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP-55,940 (2-[(1R, 2R, 5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl) cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol) impaired object recognition memory and social behaviour in both male (O'Shea, McGregor & Mallet 2006) and female (O'Shea *et al.* 2004) adult rats. However, there are scarce studies directly comparing both sexes. Chronic administration of CP-55,940 (0.4 mg/kg) induced long-term sex-dependent effects on activity/exploration and anxiety responses in novel environments (Biscaia *et al.* 2003), as well as on morphine and cocaine self-administration (Biscaia *et al.* 2008; Higuera-Matas *et al.* 2008). Adolescent (PND 28–43) exposure of male and female rats to the same dose of CP-55,940 led to impaired memory in the object location task (spatial memory) in females, and in the novel object test in males (Mateos *et al.* 2010). Rubino *et al.* demonstrated that chronic administration of THC in adolescent rats induced subtle but lasting alterations in the emotional circuits involved in depressive-like behaviour in adulthood, with these effects being observed in females but not in males (Rubino *et al.* 2008). Notably, we have also found numerous cellular and biochemical sex-dependent effects of MD (Llorente *et al.* 2007, 2008, 2009; López-Gallardo *et al.* 2008), including sex-dependent dysregulation of the endocannabinoid system (Suárez *et al.* 2009).

Despite both, MD and cannabinoid treatment during adolescence have been demonstrated to induce important long-lasting behavioural and neuroendocrine effects, the combination of the two treatments may have greater impact than each one given separately. Thus, Maynard *et al.* (2001) developed the 'two-hit' hypothesis of schizophrenia that could be applied to other psychopathologies. According to this theory, the normal early neurodevelopment would be disrupted by environmental or genetic factors ('first-hit'), and this would lead to a long-term increase in the vulnerability to a 'second-hit'. Within this framework, previous studies have analysed the interaction of MD and young adult stress (Garner *et al.* 2007; Choy *et al.* 2008; Choy, de Visser & van den Buuse 2009). In the present study, we aimed to address the possible interaction between MD stress ('first-hit') and adolescent exposure to a cannabinoid agonist ('second-hit'). In particular, we have investigated the long-term effects of MD

and/or an adolescent chronic treatment with the cannabinoid agonist CP-55,940 with the following parameters: (1) the PPI, as a measure of attentional capabilities; (2) the holeboard, as a measure of exploration; (3) the elevated plus-maze (EPM), as a measure of anxiety and risk-taking behaviour; (4) the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) function in basal conditions and in response to mild stressors, and (v) the body-weight gain and leptin levels. In all the experiments, we have analysed the possible existence of sex-differences.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Wistar rats obtained from Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain) were used. Females arrived when they were about 7 weeks old and males when they were about 9 weeks old. They were housed in the General Vivarium of the Universitat Autònoma de Barcelona, initially separated by sex in groups of 2–3 and housed in polypropylene opaque wire-topped cages with solid bottom ($21.5 \times 46.5 \times 14.5$ cm; Type '1000 cm2', Panlab S.L.U., Barcelona, Spain) containing sawdust bedding (Ultrasorb, Panlab, S.L.U.) and fed with Diet 'A04' (Safe-Panlab S.L.U.). Rats were always maintained at standard temperature conditions ($21^\circ\text{C} \pm 2$) and on a 12–12 hours light–dark schedule (lights on at 8:00 AM). The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona, followed the 'Principles of laboratory animal care' and was carried out in accordance with European Communities Council Directive (86/609/EEC).

General procedure

Rats were divided into eight different groups ($n = 12$ –16 for each group), in function of: (1) gender; (2) MD; and (3) adolescent CP treatment. As described in detail in Appendix S1, MD was performed on PND 9 (24 hours) and maternal behaviour was measured for 3 days before and after the deprivation (725 observations/mother/in total). The adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP (0.4 mg/kg, ip) was performed between PND 28 and 42. At adulthood, animals were exposed on different days to the PPI, the holeboard (5 minutes) and the EPM (5 minutes) tests. After the PPI (60 trials) and the EPM, a blood sample was taken to evaluate the reactivity of the HPA axis by radioimmunoassay. All the manipulations were performed during the morning, except CP injection that was done in the afternoon.

Statistical analysis

The 'Statistical Program for Social Sciences' (SPSS) software (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used.

Behavioural and physiological data during and after the adolescent treatment was analysed by means of the general lineal model separately for male and female rats. Between-subject factors used were MD (two levels) and CP (injection of the cannabinoid agonist CP-55,940, two levels). In some cases, additional within-subjects factors were included. Additional decompositions of the interactions were done, when needed.

RESULTS

MD: maternal behaviour and body weight

From 32 dams, 6 were excluded because they did not become pregnant and 13 because they did not give a litter with equal or more than 4 females/4 males. Thus, the final population came from 13 dams, and 3–4 dams were used for each group.

With regard to maternal behaviour measured during 3 days before and after the MD (Fig. 1), the repeated-measures analysis of variance revealed that licking–grooming was increased by MD during PND 10 [day: $F(5, 55) = 4.45$, $P < 0.01$, MD: $F(1, 11) = 7.43$, $P < 0.05$, day \times MD: $F(5, 55) = 10.62$, $P < 0.001$, differences at PND 10: $P < 0.001$]. The decomposition of the interaction also indicated that no differences appeared prior to MD during PND 6, 7 or 8 and the differences vanished at PND 11 or 12 ($P = 0.574$, $P = 0.914$, $P = 0.206$, $P = 0.083$, $P = 0.596$, respectively).

As can be seen in Fig. 2, at PND 9 (prior to the MD), groups did not differ in body weight (MD, sex, MD \times sex: no significant (NS), $P = 0.070$, $P = 0.451$, $P = 0.939$, respectively), but MD decreased body weight at PND 10 both in males and females [MD: $F(1, 100) = 126.36$, $P < 0.001$; sex and MD \times sex: NS, $P = 0.421$, $P = 0.823$, respectively].

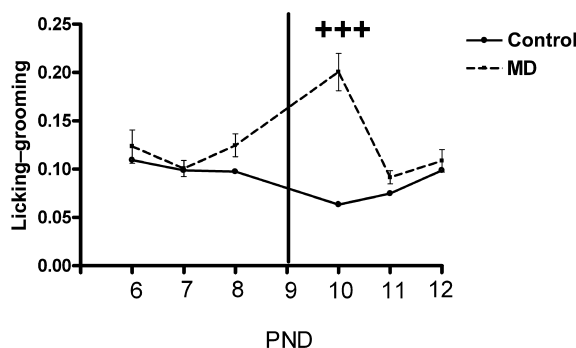


Figure 1 Licking–grooming frequency received by the litters before maternal deprivation (MD) during postnatal day (PND) 6, 7 and 8, and after MD, during PND 10, 11 and 12, in control rats and in MD rats. Means and standard error are reported; +++ $P < 0.001$, maternal deprivation effect

CP injection: motor activity and body weight

As shown in Fig. 3, the first day of injection (PND 28), CP decreased motor activity, regardless of MD treatment, in both males [CP: $F(1, 48) = 5.59$, $P < 0.05$; MD and MD \times CP: NS, $P = 0.407$, $P = 0.777$, respectively] and females [CP: $F(1, 48) = 21.50$, $P < 0.001$; MD and MD \times CP: NS, $P = 0.827$, $P = 0.465$, respectively]. The same effect was observed after the last day of injection (PND 42): males [CP: $F(1, 47) = 6.09$, $P < 0.05$; MD and MD \times CP: NS, $P = 0.350$, $P = 0.415$, respectively] and females [CP: $F(1, 48) = 10.00$, $P < 0.01$; MD and

MD \times CP: NS, $P = 0.935$, $P = 0.478$]. Twenty-four hours after the last injection (PND 43), no residual or withdrawal effect of CP was observed in motor activity, neither in males nor in females (CP, MD, MD \times CP: NS, P at least > 0.302).

Body weight gain was measured from PND 26 (previous to CP injection) to PND 60 (Fig. 4). In males, the statistical analysis showed that all the factors and interactions were statistically significant [day: $F(33, 1518) = 10703.9$, $P < 0.001$; day \times MD: $F(33, 1518) = 6.45$, $P < 0.001$, day \times CP: $F(33, 1518) = 20.19$, $P < 0.001$, day \times MD \times CP: $F(33, 1518) = 21.94$, $P < 0.001$, MD: $F(1, 46) = 13.79$, $P = 0.001$, CP: $F(1, 46) = 46.75$, $P < 0.001$, MD \times CP: $F(1, 46) = 43.77$, $P < 0.001$]. The decomposition of these interactions globally (regardless of day) indicated that in males, CP treatment decreased body weight gain only in non-MD animals [$F(1, 46) = 88.03$, $P < 0.001$]. To simplify the study of the day effect, only decompositions regarding critical days were performed. At PND 43 (the day after the last CP injection), the body weight gain was reduced more strongly in non-MD rats than in MD rats (non-MD: $P < 0.001$ versus MD: $P = 0.05$), whereas at PND 60 (at adulthood) the body weight gain was only reduced in non-MD rats ($P < 0.001$). In females, the statistical analysis showed that all factors and interactions were statistically significant except for MD and day \times MD [day: $F(33, 1551) = 5158.7$, $P < 0.001$; day \times CP: $F(33, 1551) = 15.63$, $P < 0.001$, day \times MD \times CP: $F(33, 1551) = 3.87$, $P < 0.001$, CP: $F(1, 47) = 31.20$, $P < 0.001$, MD \times CP: $F(1, 47) = 11.15$, $P < 0.01$]. The decomposition of these interactions globally (regardless

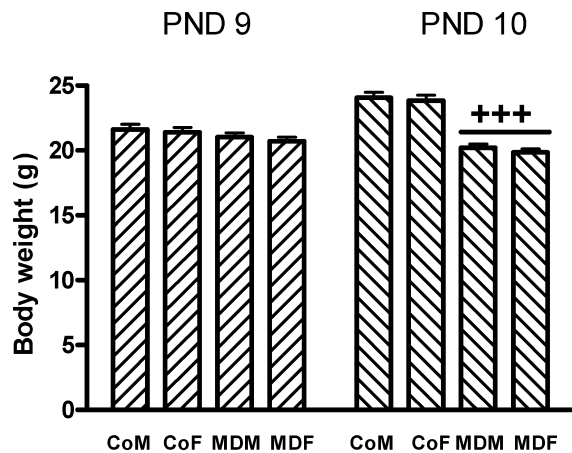


Figure 2 Body weight (g) before [postnatal day (PND) 9] and after (PND 10) maternal deprivation in males and females. Means and standard error are reported, +++ $P < 0.001$, maternal deprivation effect. CoM=control males; CoF=control females; MDM=maternal-deprived males; MDF=maternal-deprived females

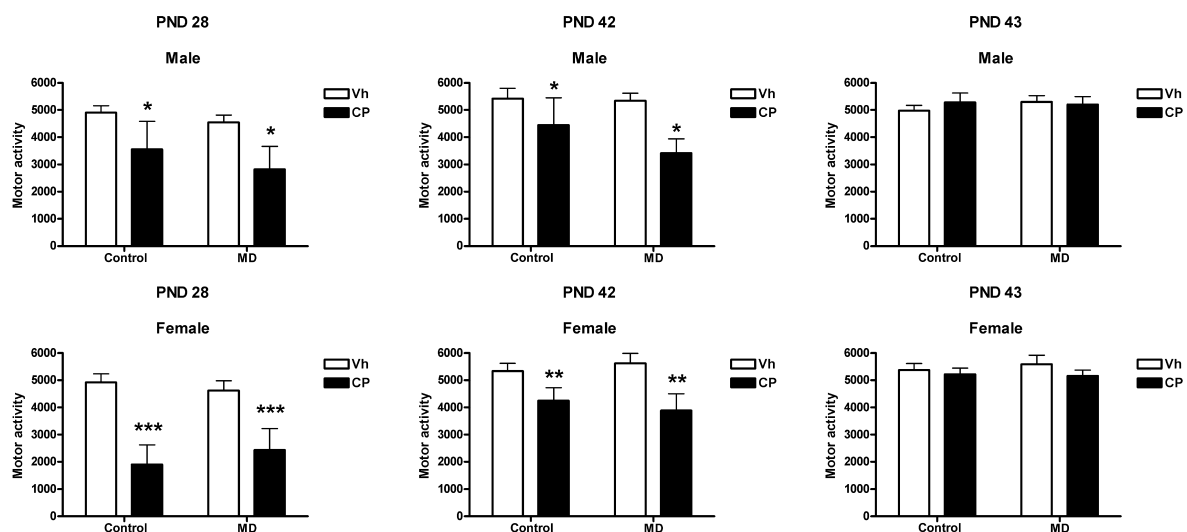


Figure 3 Motor activity (distance travelled) during a 30-minutes test after injection of CP-55,940 at 0.4 mg/kg (CP). Results are shown for the first day of injection [postnatal day (PND) 28], after 15 days of injection (PND 42) and 24 hours after the last injection (PND 43). Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation [control or maternal-deprived (MD) rats] and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, CP effect

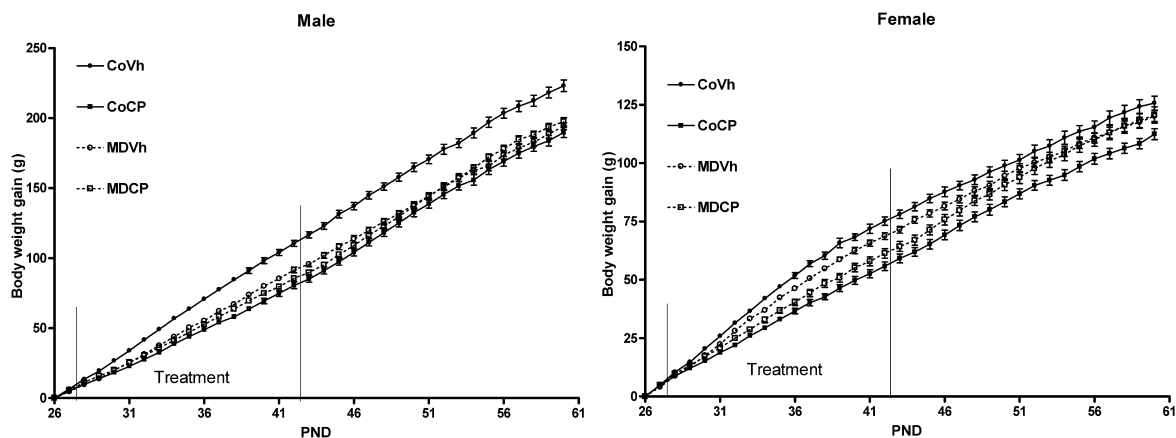


Figure 4 Body weight gain (g) between postnatal day (PND) 26 and PND 60. CP was injected between Days 28 and 42. Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard errors are reported; See main text for differences between groups. CoVh = control-vehicle; CoCP = control-CP; MDVh = MD-vehicle; MDCP = MD-CP

of day) indicated that CP treatment decreased body weight gain only in non-MD animals [$F(1, 47) = 38.24$, $P < 0.001$]. To simplify the study of the day effect, only decompositions regarding critical days were performed. At PND 43 (the day after the last CP injection), the body weight gain was reduced more strongly in non-MD rats than in MD rats (non-MD: $P < 0.001$ versus MD: $P < 0.01$), whereas at PND 60 (at adulthood) the body weight gain was only reduced in non-MD rats ($P < 0.01$).

PPI

Figure 5 shows that in males, neither MD nor CP affected PPI, being prepulse intensity the only statistically significant factor [$F(2, 94) = 22.93$, $P < 0.001$]. However, in females, previous treatment with CP decreased PPI with the higher intensity (80 dB) prepulse [CP: $F(1, 48) = 4.05$, $P = 0.050$, CP \times prepulse intensity: $F(2, 92) = 3.27$, $P < 0.05$, prepulse intensity: $F(2, 92) = 21.64$, $P < 0.001$, CP effect at 80 dB: $P < 0.01$]. All other factors and interactions were NS (P at least > 0.392). The amplitude of the response to the pulse alone was corrected by body weight, as groups still differed in this measure, but were not affected by the treatments (data not shown). No appreciable responses were measured when no stimulus was presented ($X = 10.42 \pm 0.26$ mV).

Holeboard

Whereas in males, any treatment affected holeboard measures (Fig. 6), in females, prior CP treatment increased the frequency of head-dippings [CP: $F(1, 47) = 19.91$, $P < 0.001$; MD and MD \times CP: NS, $P = 0.301$, $P = 0.216$, respectively] and entries into inner zone [CP: $F(1, 47) = 5.32$, $P < 0.05$; MD and MD \times CP:

NS, $P = 0.494$, $P = 0.868$, respectively]. The same result pattern was obtained in females for time spent head-dipping and time spent in the inner zone (data not shown). Total distance travelled (inner + outer zone) was not statistically different (CP, MD, MD \times CP: NS for both, males and females, data not shown, P at least > 0.138).

EPM

As Fig. 7 shows, in males, MD increased the percent of time on open arms [MD: $F(1, 44) = 11.91$, $P = 0.001$, CP and MD \times CP: NS, $P = 0.512$, $P = 0.421$, respectively] and the percent of open arms entries with regard to total entries [MD: $F(1, 44) = 11.63$, $P = 0.001$, CP and MD \times CP: NS, $P = 0.719$, $P = 0.387$, respectively], whereas closed arms entries were not affected by any treatment (MD, CP, MD \times CP: NS, P at least > 0.143). Moreover (data not shown), MD increased the raw number of open arms entries in males [MD: $F(1, 44) = 15.27$, $P < 0.001$, CP and MD \times CP: NS, $P = 0.240$, $P = 0.869$, respectively], the raw time spent on open arms [MD: $F(1, 44) = 11.63$, $P = 0.001$, CP and MD \times CP: NS, $P = 0.725$, $P = 0.366$, respectively] and decreased the latency to the first open arm entry [MD: $F(1, 44) = 12.53$, $P = 0.001$, CP and MD \times CP: NS, $P = 0.401$, $P = 0.157$, respectively]. On the contrary, in females, plus-maze measures were not affected.

Leptin

Regarding leptin levels (Fig. 8), in males, MD [$F(1, 33) = 5.77$, $P < 0.05$] and MD \times CP [$F(1, 33) = 5.26$, $P < 0.05$] were statistically significant, whereas CP was not ($P = 0.137$). The decomposition of the interaction indicated that, in males, MD decreased leptin levels in

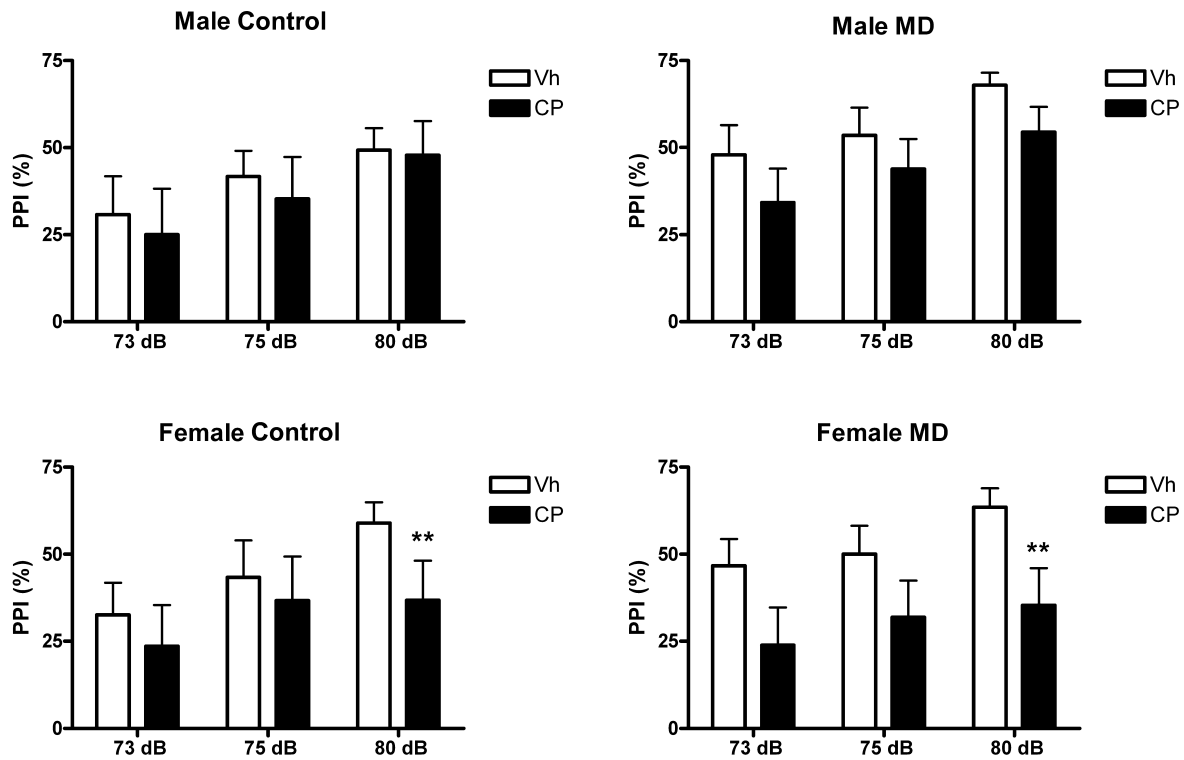


Figure 5 Prepulse inhibition (PPI) index (%) with three different prepulse intensities (73, 75 and 80 dB). Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; ** $P < 0.01$, CP effect

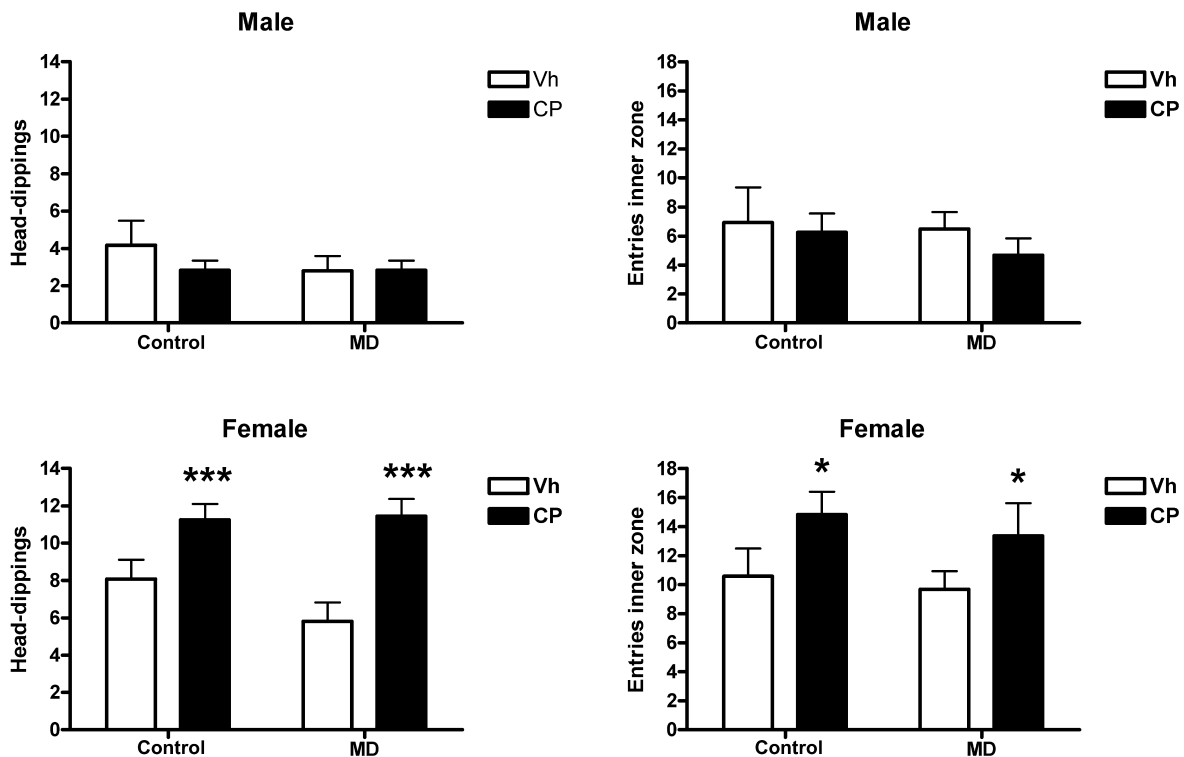


Figure 6 Number of head-dippings and entries into the inner zone of the holeboard. Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, CP effect

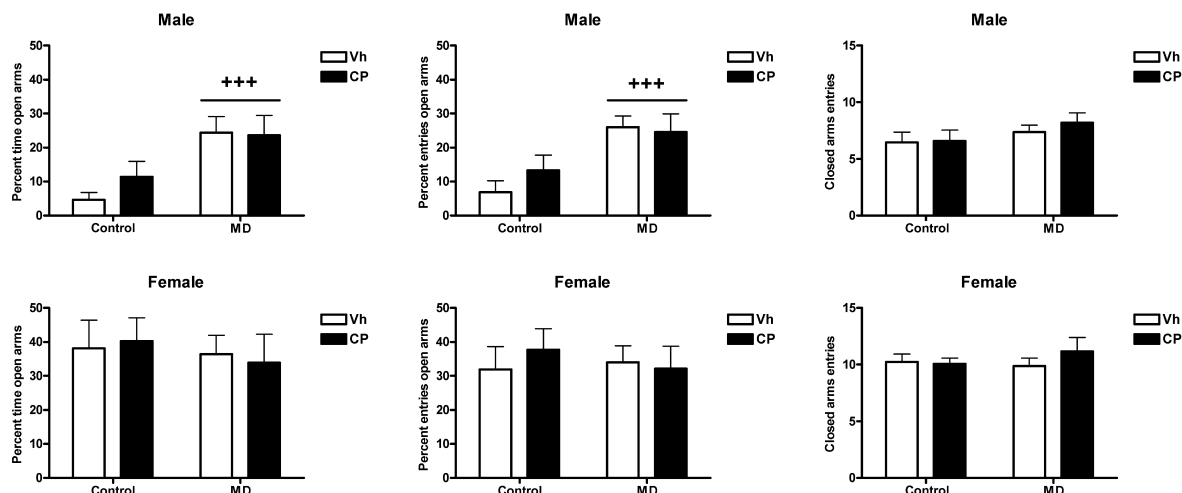


Figure 7 Representative measures in the elevated plus-maze. Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; +++ $P < 0.001$ maternal deprivation effect

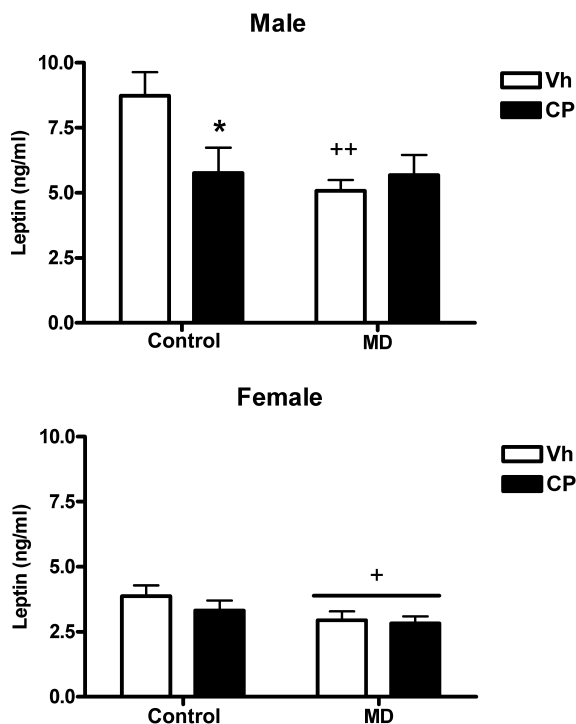


Figure 8 Leptin plasmatic levels (ng/ml). Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; * $P < 0.05$, CP effect and + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ maternal deprivation effect

Veh-injected animals ($P < 0.01$) and that CP decreased leptin levels only in non-MD animals ($P < 0.05$). On the contrary, in females, leptin levels decreased in MD rats regardless of CP treatment [MD: $F(1, 34) = 4.19$, $P < 0.05$; CP and MD \times CP: NS, $P = 0.357$, $P = 0.563$, respectively].

HPA axis and adrenal glands

After the PPI test (Fig. 9), in males, previous CP treatment increased both adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [CP: $F(1, 48) = 4.84$, $P < 0.05$; MD and MD \times CP: NS, $P = 0.194$, $P = 0.523$, respectively] and corticosterone [CP: $F(1, 48) = 8.58$, $P < 0.01$; MD and MD \times CP: NS, $P = 0.183$, $P = 0.379$, respectively] levels, whereas in females, no statistically significant effect was obtained (for both ACTH and corticosterone: MD, CP, MD \times CP: NS, P at least > 0.341). After the EPM, no statistically significant differences in ACTH levels were detected between groups (Table 1). Basal ACTH and corticosterone levels were also not affected by the treatments (Table 1, P at least > 0.131).

No statistically significant differences were found with regard to absolute adrenal weight (data not shown). As groups still differed in body weight, relative weights of the adrenal glands were also calculated (Fig. 10). In males, no treatment affected relative adrenal weight (MD, CP, MD \times CP: NS, P at least > 0.135), but in females, MD increased this measure, regardless of CP treatment [MD: $F(1, 47) = 4.04$, $P = 0.050$, CP and MD \times CP: NS, $P = 0.280$, $P = 0.662$, respectively].

DISCUSSION

The present results show that both, early MD and adolescent exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP) produced diverse sex-dependent behavioural and endocrine modifications, though no additive effects were observed after the combination of both treatments. More specifically, MD male rats showed reduced anxiety-like behaviour (or increased risk-taking) in the EPM, with no changes in exploration or HPA responsiveness to stress,

whereas no changes were observed in MD female rats. In males, no specific behavioural effects of adolescent cannabinoid treatment were found, but the treatment resulted in increased HPA responsiveness to moderate intensity stressors. In females, adolescent cannabinoid treatment increased exploration and reduced PPI without altering HPA responsiveness. At adulthood, body weight gain was reduced by prior CP injection only in non-deprived males and females. MD decreased leptin levels in males only in Veh-injected rats, whereas in females MD decreased leptin levels regardless of CP treatment.

In our hands, MD resulted in enhanced maternal behaviour (licking–grooming frequency) after reuniting the pups with the dam. To the best of our knowledge, this is the first study that provides a systematic measurement of maternal behaviour after this specific MD procedure. The observed compensatory increase in maternal care is in agreement with other studies using periodic maternal separation (Macri, Mason & Wurbel 2004) and this is critically important because it has been proposed that an increase in maternal care may buffer or compensate the negative consequences of long mother/pup separations (Macri, Chiarotti & Wurbel 2008).

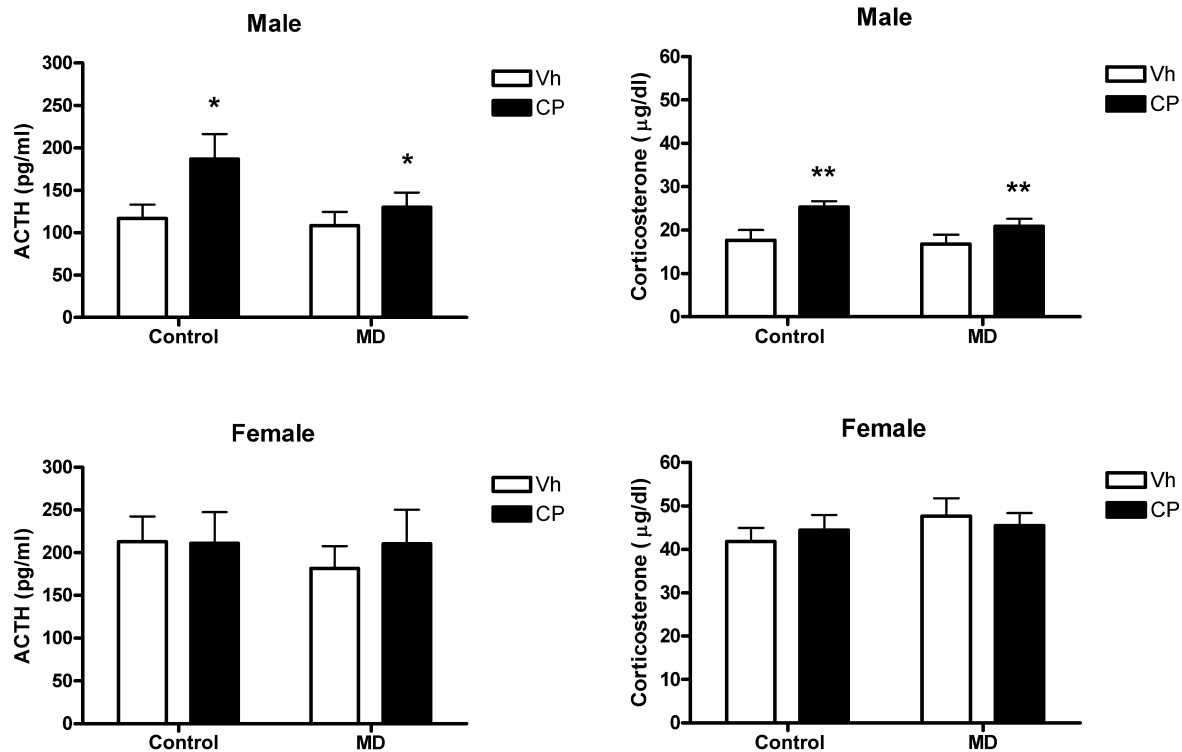


Figure 9 Adrenocorticotrophic hormone (ACTH, pg/ml) and corticosterone (μg/dl) plasmatic levels taken immediately after the PPI test. Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, CP effect

Table 1 Effects of maternal deprivation and/or juvenile cannabinoid injection on hypothalamic-pituitary-adrenal hormones in basal conditions or after exposure to a novel environment (EPM).

	Males				Females			
	Control		MD		Control		MD	
ACTH Basal	29 ± 3	27 ± 1	28 ± 2	31 ± 4	40 ± 6	76 ± 16	79 ± 14	67 ± 18
B Basal	1.6 ± 0.5	1.5 ± 0.4	2.3 ± 0.8	1.8 ± 0.3	2.7 ± 0.8	5.4 ± 1.9	4.4 ± 1.6	7.2 ± 2.5
ACTH EPM	60 ± 7	65 ± 5	70 ± 6	70 ± 4	157 ± 18	200 ± 29	200 ± 22	170 ± 23

ACTH levels (pg/ml) after exposure for 5 minutes to the EPM test in PND 72–75. Basal levels of ACTH (pg/ml) and corticosterone (B, μg/dl) were taken at PND 79–82. Animals experienced MD or remained undisturbed (control) at PND 9, and then were injected during the juvenile period (from PND28 to PND42) with a cannabinoid CB1 agonist CP-55,940 (CP). No statistically significant differences between groups were found, except for gender differences. ACTH = adrenocorticotrophic hormone; EPM = elevated plus-maze; MD = maternal deprivation; PND = postnatal day.

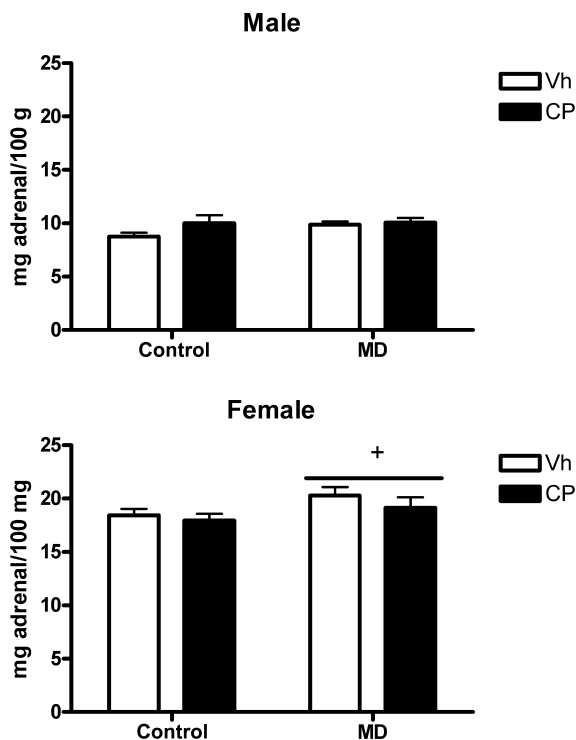


Figure 10 Relative adrenal weight (mg adrenal/100 gr of body weight). Data are given for male and female rats, in function of the maternal deprivation (control or MD rats) and CP (vehicle, Vh or CP) treatments. Means and standard error are reported; + $P < 0.05$ maternal deprivation effect

In adulthood, MD male rats showed a significant increase in the time spent in the open areas of the EPM. The increase in exploratory behaviours on the open arms of the EPM is classically interpreted as an anxiolytic-like effect (Pellow & File 1986). However, it has also been interpreted as an increase in risk-taking behaviour (i.e. Löfgren *et al.* 2006; Davis *et al.* 2009). Other anxiety-related indexes, such as the time spent in the inner parts of the holeboard, were unaffected by MD. Therefore, although critical behavioural tests are needed to discriminate between the two possibilities, we interpret the increase in the time spent on the open arms as representative of enhanced risk-taking behaviour. Indeed, we have previously found that adolescent males submitted to MD were prone to impulsive-like behaviour and increased initial reactivity to a novel environment (Marco *et al.* 2007); therefore, this behavioural pattern fits in well with an increase in risk-taking behaviour in the EPM.

In contrast to previous data (Ellenbroek, van den Kroonenberg & Cools 1998; Ellenbroek & Cools 2000, 2002; Husum *et al.* 2002; Ellenbroek *et al.* 2004), MD in the present conditions did not disrupt PPI capability in either sex. It has been claimed that the PPI impairment induced by MD is strain-specific as it has been observed in Wistar but not in Lewis or Fischer 344 rats (Ellenbroek &

Cools 2000, but see also Choy *et al.* 2009 and Lehmann, Pryce & Feldon 2000 for negative results in Wistar rats). Although the present study was performed on Wistar rats, the existence of different vendors or substrains might be additional factors affecting the outcomes of MD. In our opinion, it is more likely that the deleterious effects of MD have been somehow reverted by the extensive handling involved in the daily weighing and injection of the animals during the adolescent period. Handling during the adolescent period has more behavioural effects than similar handling at adulthood (i.e. Maldonado & Kirstein 2005). Moreover, the disruptive effects of isolation rearing in adult PPI are prevented by post-weaning handling procedures (Krebs-Thomson *et al.* 2001; Rosa *et al.* 2005). An additional critical factor to be considered is that the increase in maternal care produced by MD counteracted the putative negative consequences on PPI capability. As maternal behaviour has not been measured in previous studies using this specific MD procedure, we cannot rule out that the compensatory increase in maternal behaviour depends on the cohort or substrain of rats being tested. All these factors might also contribute to explain why under the present conditions, we did not find an increased HPA reactivity in MD adult rats. Although the effects of MD on HPA function are not always consistent (Lehmann & Feldon 2000), some studies with MD at PND9 showed increased corticosterone response to restraint at adulthood (Lehmann *et al.* 2002).

In accordance with previous data from our laboratory (Llorente *et al.* 2007), and from other authors using the 24-hour MD procedure at PND 9 (Gruss *et al.* 2008), the present results showed that MD induced long lasting decreases in body weight. Possibly related to their decreased body weights, adult MD rats of both sexes showed reduced plasma leptin levels. This latter result extends our previous finding of reduced leptin levels in 13-day old rats that were exposed to the same MD procedure (Viveros *et al.* 2009), and clearly indicates that this endocrine modification is a persistent effect of MD.

As expected from previous studies (i.e. McGregor, Issakidis & Prior 1996; Arévalo, de Miguel & Hernández-Tristán 2001), CP administration decreased motor activity in males and in females. The effect was not only detected after the first exposure to the drug but also after 15 days of injection, indicating that no strong tolerance developed. The effect of CP did not persist after interruption of treatment and was independent of MD, suggesting no interaction of MD with the inhibitory effects on activity produced by cannabinoids.

The decrease in PPI detected in CP-treated females at adulthood (when the intensity of the prepulse was of 80 dB, leading to higher levels of inhibition), agrees with previous results found in males after peripubertal (Schneider & Koch 2003; Schneider *et al.* 2005; Wegener

& Koch 2009) exposure to the CB1 agonist WIN55,212-2. However, under the present experimental conditions, PPI was not impaired in CP-treated males. Nevertheless, in relation to the effect of CP on PPI, previous electrophysiological studies have shown that acute CP administration disrupted auditory gating in the hippocampus and entorhinal cortex of anesthetized male rats (Hajós, Hoffmann & Kocsis 2008). Whereas PPI was impaired in females, the amplitude of the basal acoustic startle reflex was unaffected, suggesting that no anxiogenic or anxiolytic effects of this treatment as evaluated by the startle response were detected in this test.

Adolescent treatment with CP did not alter male behaviour in the holeboard at adulthood, whereas CP-treated female rats showed increased exploratory behaviour (head-dipping) and a decrease in anxiety-like behaviour (increased internal ambulation), in partial agreement with our previous results with a similar treatment (Biscaia *et al.* 2003). However, CP administration did not alter plus-maze behaviour, neither in males nor in females. In previous studies (Biscaia *et al.* 2003), CP exposure during the periadolescent period increased the time spent on open arms (but not the percent of entries into the open arms) in both males and females, although in other reports no long-term effects on open arms behaviour was detected after adolescent CP (Higuera-Matas *et al.* 2009) or THC (Rubino *et al.* 2008) administration. Several procedural differences such as the length of the adolescent treatment, the order of the behavioural tests at adulthood, and/or the time interval between the completion of the pharmacological treatment and the behavioural testing may explain this complex scenario.

As a whole, the present data suggest that females were more affected than males by the adolescent CP treatment in the PPI and holeboard tests. However, males appeared to be more affected by the cannabinoid agonist regarding HPA axis responsiveness. Thus, CP males showed increased ACTH and corticosterone responses to PPI test, whereas no effect of CP was found in the HPA response of females. In agreement with previous studies (Biscaia *et al.* 2003; Higuera-Matas *et al.* 2009), no effect of CP was found on baseline ACTH and corticosterone levels or in the response to a mild stressor such as the EPM, indicating that the effect of the cannabinoid agonist may appear with stressors of higher intensity than exposure to novel environments. Although the PPI test is not usually used as a stressor, the present data suggest that its intensity is slightly higher than exposure to a novel environment (EPM), and from our previous work comparing different types of stressors including restraint, the PPI test appears to be of clearly lower in intensity than restraint (Armario, Montero & Balasch 1986). On the other hand, although the PPI was administered before the EPM, the possibility that the order of administration should influence the HPA

response to the tests is unlikely in light of our previous data indicating that the order of exposure to different novel environments does not modify the initial HPA response to the tests (Márquez, Nadal & Armario 2005).

It is then possible that cannabinoid administration during adolescence may exert the long-lasting effects on HPA function in a sex-dependent manner. To our knowledge, there is no previous report of this subject, but chronic CP administration to adult male rats increased corticotrophin releasing factor mRNA levels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (Corchero, Fuentes & Manzanares 1999), a key structure in the regulation of the HPA axis (see Armario 2006 for a review), as measured 24-hours after the last injection. In addition, chronic exposure of adult male rats to high doses of the cannabinoid agonist HU-210 increased corticosterone response to restraint stress the day after the last injection of the drug (Hill & Gorzalka 2006). This is consistent with the fact that the endocannabinoid system regulates neuroendocrine responses to stress (Gorzalka, Hill & Hillard 2008). Stress also increases psychotic symptoms, and in schizophrenic patients, an enhanced HPA function that is reduced by antipsychotics has been described (Walker, Mittal & Tessner 2008). Therefore, the present data give support to the relationship between cannabis and psychosis (Fernández-Espejo *et al.* 2009), and to the idea that chronic cannabinoid administration may represent an adequate model of cannabis-induced psychotic symptoms.

According to our previous data (Biscaia *et al.* 2003), adolescent CP administration decreased body weight gain during the treatment period in both males and females. Similar effects have been shown with different cannabinoid agonists (i.e. López-Moreno *et al.* 2004; Rubino *et al.* 2008). An important part of reduced body weight gain can be attributed to the typical reduction of food intake observed after chronic cannabinoid administration (Biscaia *et al.* 2003). The reduction of food intake and body weight gain after chronic cannabinoid treatment may be secondary to the well-described down-regulation of CB1 receptors observed in several brain regions, including the hypothalamus (i.e. Romero *et al.* 1998; Sim-Selley 2003). An additional factor might be the aversive state caused by the acute administration of the drug, as assessed by conditioned place aversion procedures (McGregor *et al.* 1996). Although the decrease in locomotor behaviour induced by CP administration may also contribute, at least in part, to the decrease in food intake and leptin levels, if such reduction was related to lower energy expenditure this would not explain a reduction in body weight.

Body weight roughly paralleled circulating leptin levels in males. Thus, in non-MD males, CP treatment resulted in reduced leptin levels as measured 30–33 days

after the termination of the treatment, whereas the already reduced leptin levels of MD males were not further reduced by chronic CP treatment. In females, plasma leptin levels were reduced by MD, but not by chronic CP treatment. It is likely that the lack of effect of CP treatment in leptin levels in non-MD female rats is related to the lower relative impact of CP in body weight gain in females as compared with males (7% versus 20%). The same may apply to the lack of additional negative effects in leptin levels by CP in MD male rats. In this respect, it is worth mentioning that there is evidence for sex differences in how cannabinoids might acutely regulate various indices of energy homeostasis (i.e. food intake, metabolism, core body temperature, interactions with neural substrates known to modulate appetite) (see for review Farhang *et al.* 2009). As a whole, the effects of CP on these parameters are attributable to the well-known role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy balance (Viveros *et al.* 2008). Moreover, in a recent study, we showed the presence of an active endogenous cannabinoid system regulating energy expenditure and metabolism during adolescence (Lamota *et al.* 2008).

In summary, the present results indicate that early stressful experiences during infancy (i.e. parental neglect) and/or adolescence cannabis use may have long-lasting effects on cognitive and emotional behaviours. In males, MD seemed to reduce anxiety or enhance risk-taking behaviours whereas adolescent exposure to cannabinoids had no major behavioural effects but did increase HPA responsiveness to intermediate intensity stressors. In females, MD showed no effects, but adolescent cannabinoid exposure may promote novelty-seeking behaviours at adulthood and decrease attentional capabilities. Novelty-seeking and risk-taking personality traits may increase the probability to self-administer diverse drugs of abuse (i.e. Wills, Vaccaro & McNamara 1994; Sher, Bartholow & Wood 2000). Collectively, these effects would suggest that MD and adolescent cannabinoid treatment could increase vulnerability to develop certain psychiatric disorders such as psychosis and substance abuse.

Acknowledgements

This work was supported by grants to AA and RN from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01175), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0001/0015, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo), Plan Nacional sobre Drogas and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16). ALB was supported by a grant to MPV from Instituto de Salud Carlos III (RD06/0001/1013, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y

Consumo). Authors appreciate the help of all the AA lab in performing behavioural experiments.

Authors Contributions

MPV proposed the experiment and RN, MPV and AA were responsible for the study concept and design. ALB and SF contributed to the acquisition of animal data. HG performed the radioimmunoassay (RIA) analyses and MLG performed the leptin analysis. RN supervised all the experimental procedures and the behavioural data and AA supervised the RIA data. RN and ALB analyzed the data and produced the figures. RN wrote the first draft of the manuscript. RN, MPV and AA participated actively in the interpretation of the data and the writing of the final version of the manuscript. All authors critically reviewed content and approved the final version for publication.

References

- Adriani W, Laviola G (2004) Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* 15:341–352.
- Arévalo C, de Miguel R, Hernández-Tristán R (2001) Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav* 70:123–131.
- Armario A (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:485–501.
- Armario A, Montero JL, Balasch J (1986) Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav* 37:559–561.
- Bambico FR, Nguyen NT, Katz N, Gobbi G (2010) Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiol Dis* 37:641–655.
- Biscaia M, Fernández B, Higuera-Matas A, Miguens M, Viveros MP, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2008) Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55,940 on morphine self-administration behaviour and the endogenous opioid system. *Neuropharmacology* 54:863–873.
- Biscaia M, Marín S, Fernández B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, Viveros MP (2003) Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology* 170:301–308.
- Choy KH, de Visser Y, Nichols NR, van den Buuse M (2008) Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus* 18:655–667.
- Choy KH, de Visser YP, van den Buuse M (2009) The effect of 'two hit' neonatal and young-adult stress on dopaminergic modulation of prepulse inhibition and dopamine receptor density. *Br J Pharmacol* 156:388–396.
- Corchero J, Fuentes JA, Manzanares J (1999) Chronic treatment with CP-55,940 regulates corticotropin releasing factor and

- proopiomelanocortin gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Life Sci* 64:905–911.
- Davis JF, Krause EG, Melhorn SJ, Sakai RR, Benoit SC (2009) Dominant rats are natural risk takers and display increased motivation for food reward. *Neuroscience* 162:23–30.
- Ellenbroek BA, Cools AR (2000) The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology* 23:99–106.
- Ellenbroek BA, Cools AR (2002) Early maternal deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav* 73:177–184.
- Ellenbroek BA, de Bruin NM, van Den Kroonenburg PT, van Luijckelaar EL, Cools AR (2004) The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biol Psychiatry* 55:701–707.
- Ellenbroek BA, van den Kroonenburg PT, Cools AR (1998) The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 30:251–260.
- Ellgren M, Spano SM, Hurd YL (2007) Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 32:607–615.
- Ernst M, Romeo RD, Andersen SL (2009) Neurobiology of the development of motivated behaviors in adolescence: a window into a neural systems model. *Pharmacol Biochem Behav* 93:199–211.
- Farhang B, Diaz S, Tang SL, Wagner EJ (2009) Sex differences in the cannabinoid regulation of energy homeostasis. *Psychoneuroendocrinology* 34:S237–S246.
- Fernández-Espejo E, Viveros MP, Núñez L, Ellenbroek BA, Rodríguez de Fonseca F (2009) Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology* 206:531–549.
- Garner B, Wood SJ, Pantelis C, van den Buuse M (2007) Early maternal deprivation reduces prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: no further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment. *Behav Brain Res* 176:323–332.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156:117–154.
- Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ (2008) Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1152–1160.
- Gruss M, Braun K, Frey JU, Korz V (2008) Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats. *Neuroscience* 152:1–7.
- Hajós M, Hoffmann WE, Kocsis B (2008) Activation of cannabinoid-1 receptors disrupts sensory gating and neuronal oscillation: relevance to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 63:1075–1083.
- Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49:1023–1039.
- Higuera-Matas A, Botreau F, Miguens M, Del Olmo N, Borcel E, Peéez-Alvarez L, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2009) Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 93:482–490.
- Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, del Olmo N, Miguens M, Torres I, Vaquero JJ, Sánchez J, García-Lecumberri C, Desco M, Ambrosio E (2008) Augmented acquisition of cocaine self-administration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence. *Neuropsychopharmacology* 33:806–813.
- Hill MN, Gorzalka BB (2006) Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. *Psychoneuroendocrinology* 31:526–536.
- Husum H, Termeer E, Mathe AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA (2002) Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42:798–806.
- Kendler KS, Sheth K, Gardner CO, Prescott CA (2002) Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychol Med* 32:1187–1194.
- Krebs-Thomson K, Giracello D, Solis A, Geyer MA (2001) Post-weaning handling attenuates isolation-rearing induced disruptions of prepulse inhibition in rats. *Behav Brain Res* 120:221–224.
- Lamota L, Bermúdez-Silva FJ, Marco EM, Llorente R, Gallego A, Rodríguez de Fonseca F, Viveros MP (2008) Effects of adolescent nicotine and SR 147778 (Surinabant) administration on food intake, somatic growth and metabolic parameters in rats. *Neuropharmacology* 54:194–205.
- Lehmann J, Feldon J (2000) Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci* 11:383–408.
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (2000) Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 41:365–371.
- Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR (2002) Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:141–145.
- Levine S (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 73:255–260.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:636–650.
- Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci* 27:233–241.
- Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, López-Gallardo M, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Dev Neurobiol* 68:1334–1347.
- Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Lundgren P, Backstrom T (2006) Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav* 50:208–215.
- López-Gallardo M, Llorente R, Llorente-Berzal A, Marco EM, Prada C, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Neuronal and glial

- alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Dev Neurobiol* 68:1429–1440.
- López-Moreno JA, González-Cuevas G, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M (2004) Long-lasting increase of alcohol relapse by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 during alcohol deprivation. *J Neurosci* 24:8245–8252.
- Macri S, Chiarotti F, Wurbel H (2008) Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res* 191:227–234.
- Macri S, Mason GJ, Wurbel H (2004) Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur J Neurosci* 20:1017–1024.
- Maldonado AM, Kirstein CL (2005) Handling alters cocaine-induced activity in adolescent but not adult male rats. *Physiol Behav* 84:321–326.
- Marco EM, Adriani W, Canese R, Podo F, Viveros MP, Laviola G (2007) Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86:334–345.
- Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros MP (2009) Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 33:498–507.
- Marco EM, Viveros MP (2009) The critical role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis: avoiding excess and deficiencies. *Mini Rev Med Chem* 9:1407–1415.
- Márquez C, Nadal R, Armario A (2005) Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30:179–187.
- Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, Llorente R, Castelli M, Viveros MP (2010) Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB1 cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol* doi: 10.1177/0269881110370503 (in press).
- Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS (2001) Neural development, cell-cell signaling, and the 'two-hit' hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 27:457–476.
- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G (1996) Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53:657–664.
- Morgan C, Fisher H (2007) Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma—a critical review. *Schizophr Bull* 33:3–10.
- Morgan C, Kirkbride J, Leff J, Craig T, Hutchinson G, McKenzie K, Morgan K, Dazzan P, Doody GA, Jones P, Murray R, Fearon P (2007) Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. *Psychol Med* 37:495–503.
- O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20:611–621.
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18:502–508.
- Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525–529.
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33:1113–1126.
- Rodríguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernández-Ruiz JJ (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4:135–138.
- Romeo RD (2003) Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 15:1185–1192.
- Romero J, Berrendero F, Manzanares J, Pérez A, Corchero J, Fuentes JA, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA (1998) Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. *Synapse* 30:298–308.
- Rosa ML, Silva RC, Moura-de-Carvalho FT, Brandao ML, Guimaraes FS, Del Bel EA (2005) Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. *Braz J Med Biol Res* 38:1691–1696.
- Rubino T, Viganò D, Realini N, Guidali C, Braida D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D (2008) Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33:2760–2771.
- Schneider M (2008) Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addict Biol* 13:253–263.
- Schneider M, Drews E, Koch M (2005) Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol* 16:447–454.
- Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1760–1769.
- Schneider M, Koch M (2005) Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 30:944–957.
- Schneider M, Koch M (2007) The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:180–186.
- Schneider M, Schomig E, Leweke FM (2008) Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13:345–357.
- Sewell RA, Ranganathan M, D'Souza DC (2009) Cannabinoids and psychosis. *Int Rev Psychiatry* 21:152–162.
- Shea A, Walsh C, Macmillan H, Steiner M (2005) Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. *Psychoneuroendocrinology* 30:162–178.
- Sher KJ, Bartholow BD, Wood MD (2000) Personality and substance use disorders: a prospective study. *J Consult Clin Psychol* 68:818–829.

- Sim-Selley LJ (2003) Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev Neurobiol* 15:91–119.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417–463.
- Spear LP, Brake SC (1983) Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol* 16:83–109.
- Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19:623–632.
- Sundram S (2006) Cannabis and neurodevelopment: implications for psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol* 21:245–254.
- Van den Buuse M, Garner B, Koch M (2003) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med* 3:459–471.
- Viveros MP, Llorente R, López-Gallardo M, Suárez J, Bermúdez-Silva F, De la Fuente M, Rodríguez de Fonseca F, García-Segura LM (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34:S217–S226.
- Viveros MP, Rodríguez de Fonseca F, Bermúdez-Silva FJ, McPartland JM (2008) Critical role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy metabolism, with phylogenetic, developmental, and pathophysiological implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:220–230.
- Walker E, Mittal V, Tessner K (2008) Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 4:189–216.
- Wegener N, Koch M (2009) Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res* 1253:81–91.
- Weiss IC, Feldon J (2001) Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology* 156:305–326.
- Wenger T, Gerendai I, Fezza F, González S, Bisogno T, Fernández-Ruiz J, Di Marzo V (2002) The hypothalamic levels of the endocannabinoid, anandamide, peak immediately before the onset of puberty in female rats. *Life Sci* 70:1407–1414.
- Wills TA, Vaccaro D, McNamara G (1994) Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse* 6:1–20.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1. Supplementary methods.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

REVIEW

MATERNAL DEPRIVATION AND ADOLESCENT CANNABINOID EXPOSURE IMPACT HIPPOCAMPAL ASTROCYTES, CB1 RECEPTORS AND BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN A SEXUALLY DIMORPHIC FASHION

M. LÓPEZ-GALLARDO,^{a,e} A. B. LÓPEZ-RODRÍGUEZ,^{b,e} Á. LLORENTE-BERZAL,^{b,e} D. ROTLLANT,^c K. MACKIE,^d A. ARMARIO,^c R. NADAL^c AND M.-P. VIVEROS^{b,e*}

^aDepartamento de Fisiología, Fac. Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^bDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal II) Fac Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^cUnidad de Fisiología Animal, Unidad de Psicobiología, Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain

^dDepartment of Psychological and Brain Sciences, Indiana University, Bloomington, IN, USA

^eInstituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Abstract—We have recently reported that early maternal deprivation (MD) for 24 h [postnatal day (PND) 9–10] and/or an adolescent chronic treatment with the cannabinoid agonist CP-55,940 (CP) [0.4 mg/kg, PND 28–42] in Wistar rats induced, in adulthood, diverse sex-dependent long-term behavioral and physiological modifications. Here we show the results obtained from investigating the immunohistochemical analysis of CB1 cannabinoid receptors, glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive (+) cells and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of the same animals. MD induced, in males, a significant increase in the number of GFAP+ cells in CA1 and CA3 areas and in the polymorphic layer of the dentate gyrus (DG), an effect that was attenuated by CP in the two latter regions. Adolescent cannabinoid exposure induced, in control non-deprived males, a significant increase in the number of GFAP+ cells in the polymorphic layer of the DG. MD induced a decrease in CB1 expression in both sexes, and this effect was reversed in males by the cannabinoid treatment. In turn, the drug “per se” induced, in males, a general decrease in CB1 immunoreactivity, and the opposite effect was observed in females. Cannabinoid exposure tended to reduce

BDNF expression in CA1 and CA3 of females, whereas MD counteracted this trend and induced an increase of BDNF in females. As a whole, the present results show sex-dependent long-term effects of both MD and juvenile cannabinoid exposure as well as functional interactions between the two treatments.

This article is part of a Special Issue entitled: Stress, Emotional Behavior and the Endocannabinoid System. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: maternal deprivation, adolescent cannabinoid exposure, CB1 cannabinoid receptor, GFAP, BDNF, sex differences.

Contents	
Experimental procedure	92
Animals	92
Subjects and experimental groups	92
Tissue collection	92
Immunohistochemistry	92
Quantitative evaluation of GFAP positive (+) cells	93
Quantitative evaluation of CB1 and BDNF density	93
Statistical analysis	93
Results	93
Number of GFAP positive cells	93
CB1 receptor	95
BDNF	97
Discussion	97
Conclusions	100
Acknowledgments	101
References	101

Traumatic experiences during early developmental periods might be associated with psychopathology (such as depression or schizophrenia) and altered neuroendocrine function later in life (Levine, 2005; Moffett et al., 2007; Tyrka et al., 2008). Several experimental models attempt to mimic diverse types of early-life stress. Notably, rats submitted to a single 24-h episode of maternal deprivation (MD) at postnatal day (PND) 9 exhibit, as adults, behavioral abnormalities resembling psychotic-like symptoms, including disturbances in pre-pulse inhibition, latent inhibition, auditory sensory gating and startle habituation. Possible underlying neurochemical correlates in adult MD animals include reduced hippocampal levels of neuropeptide Y (NPY), calcitonin-gene-related peptide, polysialylated neural cell adhesion molecule and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a decrease in NMDA receptor

*Correspondence to: M.-P. Viveros, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, C/ Jose Antonio, Novais n° 2, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34-913944993; fax: +34-913944935.

E-mail address: pazviver@bio.ucm.es (M.-P. Viveros).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; Co, control non deprived animals; CP, CP-55,940; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DG, dentate gyrus; ECS, endocannabinoid system; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal; IB, immunohistochemistry buffer; MD, maternal deprivation; ml–gcl, molecular layer together with the granular cell layer; PND, postnatal day; SL–M, stratum lacunosum together with molecular; SO, stratum oriens; SR–SP, stratum pyramidale together with radiatum; Vh, vehicle; 2-AG, 2-arachidonylglycerol.

0306-4522/12 \$36.00 © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2011.09.063

subunits NR-2A and NR-2B (see for review (Ellenbroek and Riva, 2003; Ellenbroek et al., 2004)). In addition, adolescent MD rats showed depressive-like behaviors and altered responses to a cannabinoid agonist (Llorente et al., 2007), as well as a trend towards increased impulsivity (Marco et al., 2007). We have also shown that MD induced neuronal degeneration and increased number of glial fibrillary acidic protein (GFAP)+ cells in the hippocampus and cerebellar cortex of neonatal rats. Interestingly, these effects were often more marked in males. MD also produced an enduring decrease in leptin and an increase in corticosterone for both sexes (López-Gallardo et al., 2008; Llorente et al., 2008, 2009; Viveros et al., 2009). These alterations support our hypothesis that the neonatal stress accompanying MD may be a useful model to examine behavioral symptoms with a neurodevelopmental etiology.

The CB1 cannabinoid receptor is a key component of the endocannabinoid system (ECS). The ECS consists of endogenous ligands called endocannabinoids, typically anandamide (AEA) and 2-arachidonylglycerol (2-AG), which activate cannabinoid receptors (primarily CB1 and CB2 receptors, respectively). The CB1 receptor is the predominant cannabinoid receptor within the central nervous system, and is highly expressed in brain regions involved in emotional processing, motivation, motor activation and cognitive function (Mackie, 2005). Among the multiple functions of the endocannabinoid system (Viveros et al., 2005, 2007; Wotjak, 2005; Cota, 2008; Moreira and Lutz, 2008; Bermudez-Silva et al., 2010) it also plays a role in neural development (Keimpema et al., 2011).

Previously we found that neonatal MD animals had increased levels of 2-AG and decreased CB1 immunoreactivity in the hippocampus, with these alterations being more marked in males (Llorente et al., 2008; Suárez et al., 2009). Concordant with increased 2-AG levels, we recently found that MD also significantly decreased hippocampal monoacylglycerol lipase, the major 2-AG degrading enzyme, as reflected by RT-PCR and immunohistochemistry. This decrease, again, was more marked in males than in females (Suárez et al., 2010). Moreover, two inhibitors of endocannabinoid inactivation modulated the above-indicated cellular effects induced by MD stress (Llorente et al., 2007). As a whole, these data support a clear association between neurodevelopmental MD stress and dysregulation of the ECS.

Adolescence represents a critical phase in development during which the nervous system shows a unique plasticity. During this period, maturation and rearrangement of major neurotransmitter pathways are still taking place (Spear, 2000; Romeo, 2003; Laviola and Marco, 2011) including the endocannabinoid system (Rodríguez de Fonseca et al., 1993; Viveros et al., 2011a, b). The ages associated with adolescence are commonly considered to be approximately between 12 and 20–25 years in humans and around PND 28–42 in rodents (Spear, 2000; Adriani and Laviola, 2004). The early adolescent period has been identified as a phase of development particularly vulnerable to some of the adverse effects of exposure to cannabinoid compounds. Notably, in predisposed people, early exposure to cannabis increases the risk of developing

schizophrenia and may exacerbate symptoms in psychotic patients (Di Forti et al., 2007; Leweke and Koethe, 2008; Fernandez-Espejo et al., 2009; Sewell et al., 2009). In addition, both human and animal studies indicate that cannabis use during adolescence, perhaps in a sex-dependent fashion, may produce additional negative effects such as cognitive impairment, depressive symptoms and increased risk of further developing substance-abuse disorders (Sundram, 2006; Rubino et al., 2008; Schneider, 2008; Fernandez-Espejo et al., 2009; Wegener and Koch, 2009; Viveros et al., 2011a, b).

Despite neonatal MD and adolescent cannabinoid exposure having been demonstrated to induce important long-lasting behavioral and neuroendocrine effects, the combination of the two treatments has been scarcely investigated (Macri and Laviola, 2004; Llorente-Berzal et al., 2011). In our recent study on this topic (Llorente-Berzal et al., 2011), the psychophysiological effects of MD and/or adolescent exposure to CP-55,940 (CP) were studied at adulthood. MD induced a compensatory increase in maternal behavior after reunion with the dam and, in the long-term, we observed, in males, an increase of open-arm exploration in an elevated plus-maze that could be related to risk-taking behavior. Adolescent exposure to cannabinoids exerted more pronounced long-lasting behavioural effects that were evident only in females. The main behavioral alterations consisted in an increased exploration in novel environments (holeboard), which suggests an increase in novelty-seeking and in a decreased prepulse inhibition of the acoustic startle reflex, suggestive of an impairment in sensorimotor gating (attentional processes) that could increase vulnerability to psychiatric disorders such as drug addiction and schizophrenia. The reactivity of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis to an intermediate stressor was also studied and results indicated that in males the adolescent treatment with the cannabinoid increased HPA axis response. Thus, overall data supported the view that early MD and adolescent cannabinoid exposure exerted distinct sex-dependent long-term behavioural and physiological modifications that could predispose to the development of certain neurobehavioral disorders.

In the present study we have analyzed hippocampal CB1 cannabinoid receptors and GFAP positive (+) cells in the rats used in our recent paper (Llorente-Berzal et al., 2011). Our interest in these parameters and in this specific brain area was based on the following premises: the high density of hippocampal CB1 receptors (Herkenham et al., 1990), intrahippocampal cannabinoids impairs memory (Lichtman et al., 1995), and cannabinoids desynchronize hippocampal neuronal assemblies, possibly accounting for cannabinoid-induced memory impairment (Robbe et al., 2006). Moreover, morphological changes in the hippocampus have been observed following chronic administration of cannabinoids (Lawston et al., 2000; Tagliaferro et al., 2006). We had previously shown that MD induced rapid changes in the number of GFAP+ cells as well as in CB1 receptors in the hippocampus of neonatal rats (PND 13), and here we aimed to investigate whether these changes

persisted into adulthood. We have previously found that chronic treatment with the cannabinoid agonist CP-55,940, at a dose of 0.4 mg/kg/d (PND 28–43), produced long-term, sex-dependent harmful effects on memory and changes in brain CB1 receptors (Mateos et al., 2010). So, another objective of this study was to investigate possible functional interactions between MD and adolescent cannabinoid exposure on these parameters. We also addressed the effects of neonatal MD and the adolescent CP treatment on the expression of BDNF, a molecule known to regulate cell survival and differentiation. Finally, on the basis of our previous findings indicating sex-dependent effects of each treatment (MD and adolescent cannabinoid exposure) separately, we expected that the sex of the animals would have an important influence when both treatments were combined.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals

Wistar rats obtained from Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain) were used. Females arrived when they were about 7 weeks old and males when they were about 9 weeks old. They were housed in the General Vivarium of the Universitat Autònoma de Barcelona, initially separated by sex in groups of two to three and housed in polypropylene opaque wire-topped cages with solid bottom (21.5×46.5×14.5 cm³; Type “1000 cm²,” Panlab SLU, Barcelona, Spain) containing sawdust bedding (Ultrasorb, Panlab, SLU) and fed with Diet “A04” (Safe-Panlab SLU). Rats were always maintained at standard temperature conditions (21 °C±2) and on a 12–12 h light–dark schedule (lights on at 8:00 AM). The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona, followed the “Principles of laboratory animal care” and was carried out in accordance with European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Subjects and experimental groups

Maternal deprivation was performed on PND 9 for 24 hours as previously described (Llorente et al., 2007). In brief, mothers were removed early in the morning (beginning at 9:00 h, i.e., 1 h after the beginning of the light phase) and pups were weighed and remained undisturbed in their home cages (in the same room as their mothers) for 24 h. On PND 10 mothers were returned to their corresponding cages. Mothers from the control groups were briefly removed from their home cages while the pups were weighed. The adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940 (0.4 mg/kg/d) i.p. or its corresponding vehicle (ethanol: cremophor:saline 1:1:18; Cremophor® EL Fluka, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was performed between PND 28 and 42. The time-interval and length of the treatment and the dose of CP used were chosen on the basis of the above mentioned data from Spear (2000); Rodríguez de Fonseca et al. (1993); Adriani and Laviola (2004) and from previously published data from our laboratory (Biscaia et al., 2003, 2008; Mateos et al., 2010) and others (Higuera-Matas et al., 2008, 2009).

Maternal behavior was assessed for 3 days before and after the maternal deprivation. At adulthood, a battery of behavioral tests was performed consisting of the prepulse inhibition of the startle response (PPI), the holeboard and the elevated plus maze (EPM) tests. After the PPI and the EPM, a blood sample was taken to evaluate the reactivity of the HPA axis. Methodological details and results obtained in this first part of the study are thoroughly explained in Llorente-Berzal et al. (2011).

In the present work, we show the results obtained in the neuroimmunohistochemical study described below, which was

carried out on the hippocampi of the animals used for the behavioral analysis. On the basis of maternal manipulation [MD or non MD (Co (Control non deprived animals))] and the adolescent treatment [pharmacological treatment with the cannabinoid agonist CP or Vehicle (Vh)], the following experimental groups were formed for each sex: Co-Vh, Co-CP, MD-Vh and MD-CP. In total, we had eight experimental groups with six animals per group.

Tissue collection

Rats were anesthetized with isoflurane at PND 80, and perfused with saline solution (4 °C) for 2 min followed by paraformaldehyde 4% (Merck) and sodium borate 3.8% (4 °C) for 12 min. Then brains were removed and post-fixed overnight at 4 °C. After that, brains were changed to a cryoprotectant solution (0.2 M NaCl, 43 mM potassium phosphate (KPBS) containing 30% sucrose, pH=7.2) for 48 h at 4 °C. Then, brains were frozen on dry ice and stored at –80 °C. From every brain, four series of 20 µm sections from bregma 4.00 to –11.00 mm (Paxinos and Watson, 2007) were obtained using a cryostat (Leica), and stored at –20 °C in an anti-freeze solution (30% ethyleneglycol, 20% glycerol in 0.25 mM phosphate buffer at pH 7.3).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses were performed in medial hippocampus, on free-floating sections under moderate shaking. All washes and incubations were done in 0.1 M PB pH 7.4, containing 0.3% bovine serum albumin and 0.3% triton X-100, which constituted the immunohistochemistry buffer (IB). Endogenous peroxidase was blocked for 10 min at room temperature in a solution of 3% hydrogen peroxide in 50% methanol. After several washes in IB, sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody and then rinsed in IB and incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibody.

We evaluated the astroglial reaction by studying changes in the GFAP, the main intermediate filament of astrocytes, as the most adequate marker for the present immunochemical analysis. It defines the astrocytic morphology and it is possible to evaluate the astroglial reaction by studying changes in GFAP expression (Tagliaferro et al., 1997). We used a monoclonal antibody for GFAP as primary antibody [Rabbit anti-GFAP Ig G, 1:1000 dilution (SIGMA, Madrid, Spain, Ref: G9269)] and a biotinylated donkey anti-rabbit Ig G as secondary antibody, 1:300 dilution [Healthcare, Madrid, Spain, Ref: RPN, 1004].

For CB1 cannabinoid receptor analysis, a polyclonal antibody for CB1 was used as primary antibody, 1:500 dilution [provided by Dr. Ken Mackie] and a biotinylated goat anti-rabbit IgG as secondary antibody, 1:300 dilution [Pierce, Rockford, USA, Ref: 31820].

In order to evaluate BDNF expression, a polyclonal antibody for BDNF was used as primary antibody, 1:200 dilution [Rabbit polyclonal IgG anti BDNF (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, Ref: sc-546)] and a biotinylated donkey anti-rabbit IgG as secondary antibody, 1:300 dilution (GE Healthcare, Madrid, Spain, Ref: RPN 1004V).

After incubations with the specific antibodies, sections were washed several times in IB and then were incubated for 90 min at room temperature with avidin-biotin peroxidase complex (Immunopure ABC peroxidase staining kit, Pierce, Rockford, IL, USA, 1:250 dilution). The reaction product was revealed by incubating the sections with 2 µg/ml 3, 3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 0.01% hydrogen peroxide in 0.1 M PB. Then, sections were dehydrated, mounted on gelatinized slides and coverslipped with mounting medium dibutyl phthalate in xylene (DEPEX, Serva, Heidelberg, Germany).

To check the specificity of the immunoreaction, we included control preparations (omitting the primary antibody) in each immunostaining batch. Immunostaining batches containing all the

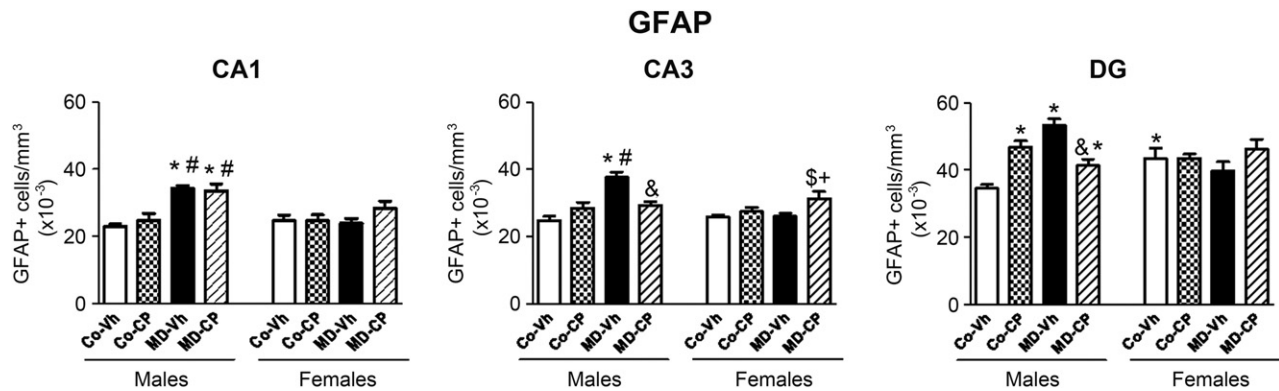


Fig. 1. Effects of maternal deprivation (MD) and/or adolescent exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 on hippocampal GFAP positive (+) cells of adult male and female rats. Quantification of the number of GFAP positive cells (GFAP+/mm³) was carried out in the CA1 and CA3 areas of the Ammon's Horn and in the polymorphic layer of the Dentate Gyrus (DG). Histograms represent the mean \pm SEM of six animals per experimental group. MD, maternal deprivation; Co, control non MD animals; Vh, vehicle (see text); CP, CP 55,940. Significant differences, $P < 0.05$: * vs. CoVh male; # vs. CoCP male; & vs. MDVh male; \$ vs. CoVh female; + vs. MDVh female.

experimental groups as well as the internal control were run for males and females separately. Two different batches were run for each primary antibody and for each animal.

Slides immunostained for GFAP, CB1 or for BDNF were observed in a Zeiss Axioplan Microscope (Germany). The microscope had attached a camera (ZEISS Axiocam), through which the images were captured to be processed using Axiovision 4.0 V 4.1 (Carl. Zeiss vision GMBH). Panel illustrations were made by mounting the selected images with Adobe Photoshop 8.0, with adjustments of contrast and brightness for faithful reproduction of colors seen in the prints.

Quantitative evaluation of GFAP positive (+) cells

The number of GFAP+ cells was estimated by the optical disector method (Reed and Howard, 1998) using total section thickness for disector height (Hatton and von Bartheld, 1999), and a counting frame size of 0.215 mm of width and 0.26 mm of length. A total number of 20 counting frames were assessed for each animal and each zone analyzed. Section thickness was measured using a digital length gauge device (Heidenhain-Metro MT 12/ND221; Traunreut, Germany) attached to the stage of a Leitz Laborlux 8 microscope. All counts were performed on coded sections.

Quantification of GFAP+ cells was made with the 20 \times objective. Four tissue sections per animal were analyzed. On each tissue section we focused on CA1 and CA3 areas of Ammon's horn and on the dentate gyrus (DG). In each of these zones cell nuclei from immunoreactive cells that came into focus, while focusing down through the disector height, were counted. Data were expressed as number of GFAP+ cells per mm³.

Quantitative evaluation of CB1 and BDNF density

Quantification of CB1 and BDNF immunostaining was carried out on high-resolution digital microphotographs that were taken with the 10 \times objective and under the same conditions of light and brightness/contrast, by measuring densitometry of the selected areas using the analysis software ImageJ 1.383 (NIH, USA).

Four tissue sections per animal were analyzed. On each tissue section we focused on CA1 and CA3 areas of Ammon's horn and on the DG. For both CA subfields, we carried out separate densitometrical analysis as follows. For CB1 cannabinoid receptor, we analyzed separately (1) stratum oriens (SO), (2) stratum pyramidale together with radiatum (SR-SP), and (3) stratum lacunosum together with moleculare (SL-M). For DG, we carried out separate densitometrical analysis corresponding to (1) the molecular layer (ml) together with the granular cell layer (gcl)

and (2) the polymorphic cell layer. The densitometrical analysis corresponding to BDNF was carried out in stratum radiatum (SR) for CA1 and CA3 areas and for DG in the polymorphic cell layer. All data were expressed in arbitrary units.

Statistical analysis

Data were analyzed using a three-way analysis of variance (ANOVA), with factors being sex, neonatal manipulation and pharmacological treatment. The criterion of normally distributed data were not always met in some populations of this study, so in order to satisfy the assumption of normality for the ANOVA, data were transformed when necessary by the Neperian logarithm function. When appropriate, three-way ANOVAs were followed by separate two-way ANOVA split by one of the independent factors to further clarify the results. Post hoc comparisons were performed with a level of significance set at $P < 0.05$. For data that were normal and homoscedastic, standard parametric post hoc tests were used (Tukey's test) and for those that were normal but non-homoscedastic, non-parametric post hoc comparisons were performed (Games-Howell's test). Statistical analyses were carried out with the SPSS 19.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

So that the presentation of the high number of statistical data obtained is compatible with the comprehension of the "home take message", we have organized the result section as follows. For each parameter measured, we first indicate the statistical results and then a summary paragraph highlighting the main results. To avoid an excessive length of the text we have sometimes used abbreviations. It would be useful to the reader to recall here some of them: MD, maternal deprivation; CP, CP55940; Co, Control non deprived animals; Vh, vehicle.

Number of GFAP positive cells

Quantitative results from GFAP immunohistochemistry are represented in Fig. 1. Fig. 2 shows representative microphotographs for the different experimental groups.

In CA1, the three-way ANOVA rendered a significant sex \times MD interaction [$F(1,49) = 12.72$, $P < 0.05$] as well as significant effects of sex [$F(1,49) = 8.27$, $P < 0.05$] and MD

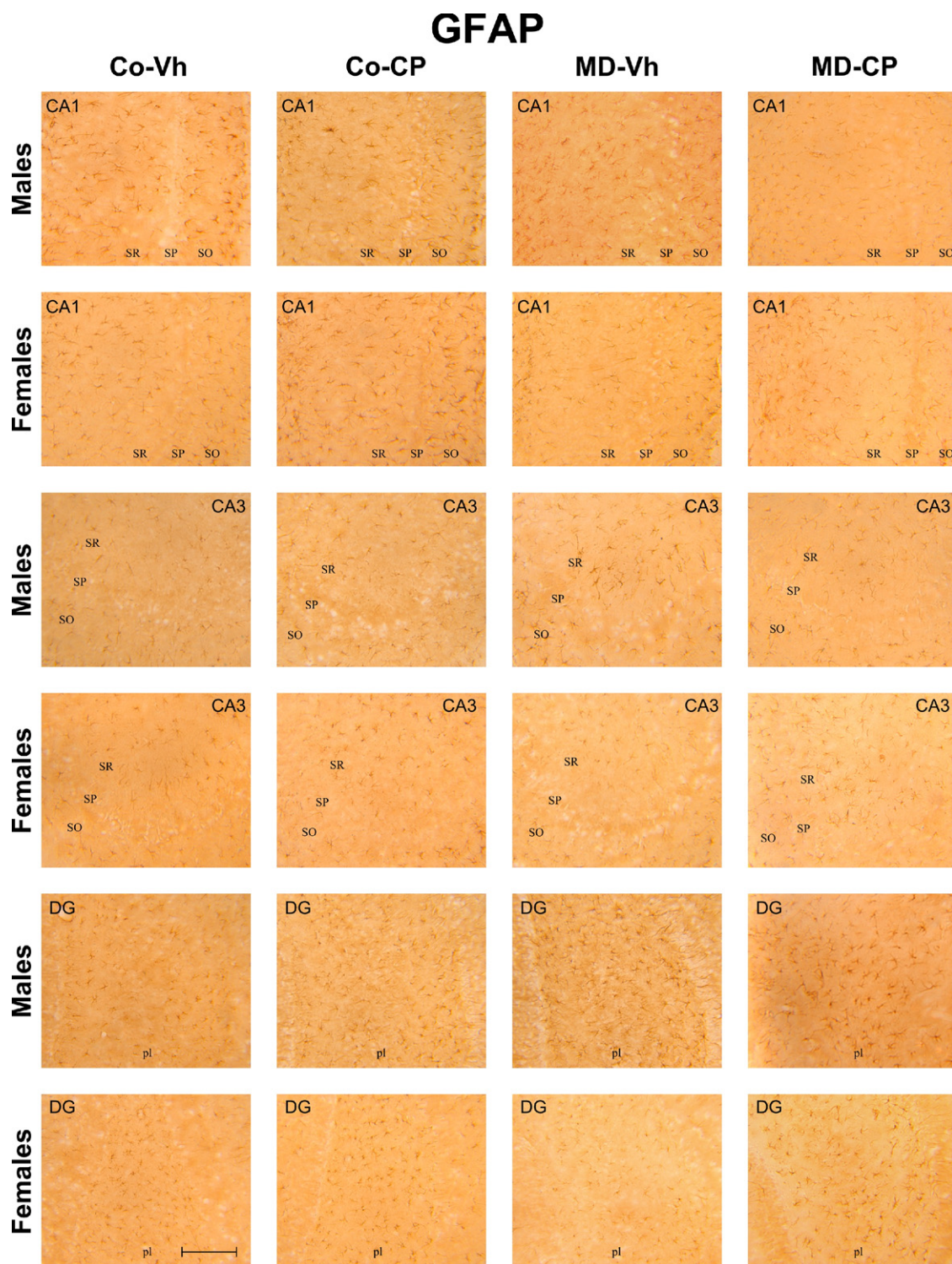


Fig. 2. Representative microphotographs of hippocampal GFAP+ glial cells after maternal deprivation (MD) and adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP) in CA1, CA3 and Dentate Gyrus (DG) of adult male and female rats. Scale bar 5 μ m. MD, maternal deprivation; Co: control non MD animals; Vh: vehicle (see text); CP, CP 55,940; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; pl, polymorphic layer.

[$F(1,49) = 22.70$, $P < 0.05$]. Subsequent two-way ANOVA split by sex revealed a significant effect of the MD among males [$F(1,25) = 37.34$, $P < 0.05$] but it did not show any

effect in females. Post hoc comparisons showed a significant increase of GFAP+ cells in maternally deprived males when compared with their control counterparts.

The three-way ANOVA of the number of GFAP+ cells quantified in CA3 rendered significant effects of the triple interaction sex×MD×pharmacological treatment [$F(1,49) = 14.29, P<0.05$] and of two double interactions, that is, sex×MD [$F(1,49) = 5.98, P<0.05$] and sex×pharmacological treatment [$F(1,49) = 6.75, P<0.05$] as well as significant effects of sex [$F(1,49) = 4.88, P<0.05$] and MD [$F(1,49) = 19.19, P<0.05$]. Subsequent two-way ANOVA split by sex revealed a significant interaction MD×pharmacological treatment in males [$F(1,25) = 15.36, P<0.05$] as well as a significant effect of MD [$F(1,25) = 21.88, P<0.05$]. Post hoc comparisons revealed a significant increase in the number of GFAP+ cells in MD animals that was reversed by the cannabinoid agonist treatment. In females the two-way ANOVA indicated a significant effect of the pharmacological treatment [$F(1,24) = 6.65, P<0.05$]; MD females treated with CP showed an increase in the number of cells GFAP+ compared with the MDVh female group; while a decrease in the number of cells GFAP+ was observed in MDCP males when compared with MDVh males.

In the DG, the three-way ANOVA revealed the following significant interactions: sex×MD×pharmacological treatment [$F(1,49) = 23.88, P<0.05$], sex×MD [$F(1,49) = 5.01, P<0.05$] and MD×pharmacological treatment [$F(1,49) = 8.24, P<0.05$]. Two-way ANOVA test split by sex revealed a significant interaction between MD and the pharmacological treatment, [$F(1,25) = 47.99, P<0.05$] and a significant effect of MD [$F(1,25) = 14.14, P<0.05$] in males, whereas no significant effects were found in females. Post hoc analyses showed a sexual dimorphism among control animals with females showing a significant higher number of GFAP+ cells than males. In addition, a significant increase in the number of GFAP+ cells due to MD and/or adolescent treatment with the CB1 agonist in males was also revealed and this effect was reversed by CP treatment in maternally deprived males.

To sum up, the number of GFAP+ cells in all experimental groups is higher in the polymorphic cell layer of DG than in CA1 and CA3 areas. Control females exhibited higher basal levels of GFAP+ cells when compared with control males in the polymorphic cell layer of DG. In turn, adolescent treatment with CP induced an increase in the number of GFAP+ cells particularly in the polymorphic cell layer of males DG, whereas no significant effect of CP was found in females. In males, MD induced a significant increase in the number of GFAP+ cells in all the areas analyzed, which was reversed by the CP treatment in CA3 and polymorphic cell layer of DG but not in CA1. However, in females MD per se did not induce any modification in the number of GFAP+ cells.

CB1 receptor

Results corresponding to the quantification of the CB1 receptor immunoreactivity are shown in Fig. 3.

We focused on CA1 and CA3 areas of Ammon's horn and on the DG. For both CA subfields, we analyzed separately (1) SO, (2) SR–SP and (3) SL–M. For DG, we carried out separate densitometrical analysis corresponding to (1) the ml together with the gcl and (2) the polymorphic cell layer. We have undertaken a detailed analysis of these separate

areas and strata in light of previous results of our group (Suárez et al., 2009). These results provided an original description of CB1 distribution within the hippocampus of 13-day-old rats that was in agreement with previous descriptions in adult animals (Egertová and Elphick, 2000). Thus, it seems that at PND 13 the CB1 receptor is already in its final distribution, and for this reason we decided to carry out the same design of analysis in the present study. In SO of CA1 the three-way ANOVA revealed the following significant interactions: sex×MD×pharmacological treatment [$F(1,40) = 18.06, P<0.05$], sex×MD [$F(1,40) = 10.68, P<0.05$], sex×pharmacological treatment [$F(1,40) = 28.28, P<0.05$] and MD×pharmacological treatment [$F(1,40) = 27.51, P<0.05$] as well as a significant effect of the pharmacological treatment [$F(1,40) = 6.82, P<0.05$]. In males the two-way ANOVA revealed a significant MD×pharmacological treatment interaction [$F(1,20) = 44.86, P<0.05$]. In females, the two-way ANOVA rendered significant effects of neonatal MD [$F(1,20) = 13.56, P<0.05$] and of the pharmacological treatment [$F(1,20) = 31.60, P<0.05$]. In males, post hoc analyses showed a decrease in the CB1 immunoreactivity due to each treatment (MD and adolescent CP administration) considered separately. However, in the animals receiving both treatments CB1 receptor expression was not significantly different from control rats. In females, the cannabinoid treatment increased the expression of CB1 receptor in non-maternally deprived animals; MD, per se, induced the opposite effect and animals receiving both treatments showed values that were similar to those corresponding to the pure controls, that is, control vehicle animals. In the SR–SP of CA1 area, the three-way ANOVA revealed the following significant interactions: sex×MD×pharmacological treatment [$F(1,40) = 10.19, P<0.05$], sex×pharmacological treatment [$F(1,40) = 5.45, P<0.05$] and MD×pharmacological treatment [$F(1,40) = 5.15, P<0.05$]. Subsequent two-way ANOVA split by sex revealed a significant MD×pharmacological treatment interaction [$F(1,20) = 12.49, P<0.05$] in males and a significant effect of the pharmacological treatment [$F(1,20) = 4.88, P<0.05$] in females. Post hoc comparisons showed that CP induced a significant decrease in CB1 receptor density, whereas this effect appeared to be reversed in males receiving both treatments. In SL–SM of CA1 area, the three-way ANOVA revealed the following significant interactions: sex×MD×pharmacological treatment [$F(1,40) = 30.21, P<0.05$], sex×MD [$F(1,40) = 15.88, P<0.05$] and MD×pharmacological treatment [$F(1,40) = 15.13, P<0.05$] as well as a significant effect of MD [$F(1,40) = 10.88, P<0.05$]. Two-way ANOVA split by sex rendered a significant MD×pharmacological treatment interaction [$F(1,20) = 38.20, P<0.05$] in males, and a significant effect of MD [$F(1,20) = 31.33, P<0.05$] in females. Post hoc comparisons revealed that, in males, both MD and the cannabinoid treatment when considered separately, significantly decreased CB1 immunoreactivity, whereas animals receiving both treatments were not different from controls. On the other hand, females receiving both treatments showed a significant reduction of CB1 immunoreactivity.

In CA3, we separately studied SO and the SR–SP. In both cases, the three-way ANOVA rendered similar results, revealing significant effects of the triple interaction

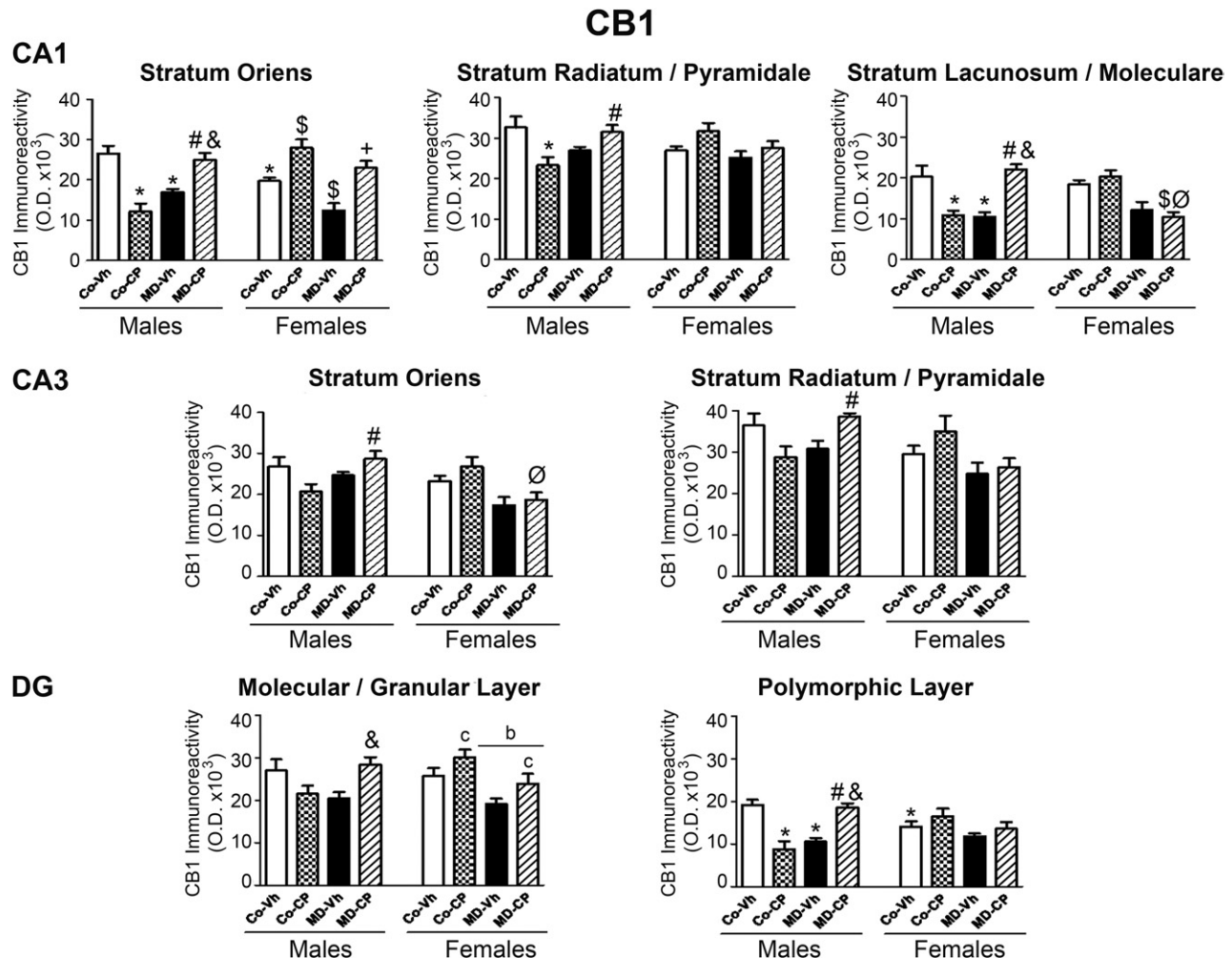


Fig. 3. Effects of maternal deprivation (MD) and/or adolescent exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 on hippocampal CB1 cannabinoid receptors expression of adult male and female rats. Quantification of CB1 receptor immunoreactivity was carried out in CA1, and CA3 areas of Ammon's Horn and in the Dentate Gyrus (DG). Histograms represent the mean \pm SEM of six animals per experimental group. MD, maternal deprivation; Co, control non MD animals; Vh, vehicle (see text); CP, CP 55,940. ANOVA ($P < 0.05$); b, significant overall effect of maternal deprivation; c, significant overall effect of chronic CP treatment. Significant differences, $P < 0.05$: * vs. CoVh male; # vs. CoCP male; & vs. MDVh male; \$ vs. CoVh female; Ø vs. CoCP female; + vs. MDVh female.

sex \times MD \times pharmacological treatment [SO, $F(1,40) = 5.48$, $P < 0.05$; SR-SP, $F(1,40) = 7.44$, $P < 0.05$], the double interaction sex \times MD [SO, $F(1,40) = 14.46$, $P < 0.05$; SR-SP, $F(1,40) = 6.13$, $P < 0.05$] and of sex [SO, $F(1,40) = 7.92$, $P < 0.05$; SR-SP, $F(1,40) = 7.05$, $P < 0.05$]. Two-way ANOVA analysis split by sex rendered similar effects in both cases (SO and SR-SP). In males significant effects of the double interaction MD \times pharmacological treatment was found [SO, $F(1,20) = 7.70$, $P < 0.05$; SR-SP, $F(1,20) = 12.10$, $P < 0.05$]. In females, in SO area the two-way ANOVA revealed a significant effect of the pharmacological treatment [$F(1,20) = 13.73$, $P < 0.05$] while in SR-SP it rendered a significant effect of MD [$F(1,20) = 5.85$, $P < 0.05$]. In males, post hoc comparisons showed an increase in CB1 immunoreactivity in SO and SR-SP of CA3 in MDCP group when compared with MDVh. In females, a decrease of CB1 immunoreactivity in SO area was found in MDCP when compared with the CoCP group. The post hoc tests also revealed that, in both strata,

MDVh and MDCP males showed higher levels of CB1 immunoreactivity than the corresponding female counterparts.

For the DG area, we carried out separate densitometrical analysis corresponding to (1) the molecular layer together with the granular cell layer (ml-gcl) and (2) the polymorphic cell layer. In both cases, the three-way ANOVA revealed significant effects of the triple interaction sex \times MD \times pharmacological treatment [ml-gcl, $F(1,40) = 5.82$, $P < 0.05$; polymorphic layer, $F(1,40) = 24.77$, $P < 0.05$]; the double interaction MD \times pharmacological treatment [ml-gcl, $F(1,40) = 6.55$, $P < 0.05$; polymorphic layer, $F(1,40) = 21.69$, $P < 0.05$]. Besides, in ml-gcl, the three-way ANOVA also rendered a significant effect for the double interaction sex \times MD [$F(1,40) = 5.82$, $P < 0.05$], MD [$F(1,40) = 5.07$, $P < 0.05$] and pharmacological treatment [$F(1,40) = 4.51$, $P < 0.05$]. Subsequent two-way ANOVA within males showed that the interaction MD \times pharmacological treatment was significant in both, ml-gcl [$F(1,20) = 11.74$, $P < 0.05$] and poly-

morphic layer [$F(1,20) = 50.97$, $P < 0.05$]. The corresponding two-way ANOVA in females revealed significant effects of MD [$F(1,20) = 11.48$, $P < 0.05$] and pharmacological treatment [$F(1,20) = 5.87$, $P < 0.05$] in ml–gcl, whereas in polymorphic layer only a trend for MD was found ($P = 0.085$). Post hoc comparisons revealed a sexual dimorphism among control groups, with females showing lower levels of CB1 immunoreactivity in the polymorphic layer than their male counterpart. Separately, both MD and adolescent cannabinoid exposure decreased CB1 immunoreactivity in the polymorphic layer in males, whereas males receiving both treatments showed a “normalized” CB1 receptor density. In Co-CP females a slight increase in CB1 receptor expression was found, whereas MD tended to decrease CB1 expression in both areas of the DG. Again, the combination of both treatments tended to normalize CB1 staining. In short, the above analyses reveal the following main results. In general, control females exhibited lower basal levels of CB1 receptor when compared with control males. In males, adolescent CP treatment induced a decrease in CB1 receptor density, whereas in females the opposite effect was found. The MD procedure induced a decrease in CB1 immunoreactivity in both sexes. Treatment with the cannabinoid agonist reversed the effects induced by MD in males, but not in females.

Fig. 4 shows representative microphotographs of CB1 immunoreactivity from CA1, CA3 and DG of all the experimental groups. CB1 immunoreactivity in the CA1 and CA3 areas was associated with fibers in the stratum radiatum and in the stratum pyramidale. A fine meshwork of stained fibers was evident in the stratum oriens of CA1 and CA3. The CB1 immunoreactivity was associated in DG with a network of fibers in the granular cell layer, molecular layer and in the polymorphic layer. We observed that the staining was more intense in CA3 than in CA1 and DG.

BDNF

The changes in the intensity of BDNF immunohistochemistry staining were mainly observed in the stratum radiatum of CA1 and CA3 areas and in the polymorphic layer of the DG (microphotographs not shown), for that reason we analyzed the neuropil of these strata by a densitometric study. Results corresponding to the quantification of BDNF immunoreactivity are shown in Fig. 5.

In CA1 the three-way ANOVA rendered a significant effect of the triple interaction sex×MD×pharmacological treatment [$F(1,46) = 6.14$, $P < 0.05$]. Two-way ANOVA within females revealed a significant increase in BDNF expression in maternally deprived animals when compared with control groups [$F(1,22) = 6.14$, $P < 0.05$], while in males no significant effects were found.

In CA3 the three-way ANOVA revealed a significant effect of the double interaction sex×MD [$F(1,46) = 5.58$, $P < 0.05$]. Subsequent two-way ANOVA split by sex rendered significant effects of the double interaction MD×pharmacological treatment [$F(1,22) = 5.68$, $P < 0.05$] and MD [$F(1,22) = 11.34$, $P < 0.05$] in females, whereas no significant effects were found in males.

In DG the three-way ANOVA revealed strong trends for MD ($P = 0.060$) and for the double interaction sex×MD ($P = 0.097$). In order to further elucidate possible significant effects we performed additional two-way ANOVA. The two-way ANOVA split by sex revealed a significant effect of the double interaction MD×pharmacological treatment; [$F(1,18) = 5.00$, $P < 0.05$] in males and a significant effect of MD [$F(1,19) = 6.21$, $P < 0.05$] in females. The two-way ANOVA split by pharmacological treatment revealed a significant effect of the double interaction sex×MD [$F(1,18) = 4.59$, $P < 0.05$] in the vehicle injected animals, and a significant effect MD [$F(1,19) = 6.98$, $P < 0.05$] in the CP treated animals.

The main results regarding BDNF measurement can be summarized as follows. Control females exhibited lower basal levels of BDNF when compared with control males in CA3 and in DG. As Fig. 5 shows, the clearest differences were found in females. In this sex, adolescent cannabinoid exposure induced a decrease of BDNF expression in CA1 and CA3 areas that appeared to be compensated by MD, whereas the combination of both treatments appeared to result in an increase in BDNF in DG.

DISCUSSION

The present results show that both, MD and adolescent cannabinoid exposure induced long-term sex-dependent effects on hippocampal GFAP, CB1 receptors and BDNF levels. In glial cells in the polymorphic cell layer of the DG adult control females exhibited higher basal levels of GFAP+ cells than males. Previously we found that PND 13 control females showed more hippocampal GFAP+ cells than control males. Moreover, we also found that control females showed more hippocampal Fluoro Jade-C (FJ-C)+ cells (i.e., degenerating neurons) than control males (Llorente et al., 2009). These data suggest that, at PND 13, the rates of “natural” apoptosis and astrocyte proliferation may be greater in females than in males. Potentially, these developmental differences might be involved in the generation of the sexual dimorphisms observed here in the adult animals. MD induced, in males, a significant increase in the number of GFAP+ cells in CA1 and CA3 areas and in the polymorphic layer of the DG. In a previous study this same MD procedure (24 h MD at PND 9) induced at PND 13 a significant increase in the number of GFAP+ and Fj-C+ cells in the hippocampus (Llorente et al., 2009). The present data demonstrate that the effect of MD is long lasting. The treatment with CP also induced, in control non-MD males, a significant increase in the number of GFAP+ cells in the polymorphic layer of the DG.

The differences in the number of GFAP+ immunoreactive cells induced by the present treatments may reflect developmental effects on the differentiation and proliferation of astrocytes or the activation of formerly quiescent astrocytes. An increased expression of GFAP and an increase in the number of GFAP+ immunoreactive astrocytes are markers of reactive gliosis that is associated to neurodegenerative modifications (Eng and Ghirnikar, 1994). One of the possible molecular changes in reactive

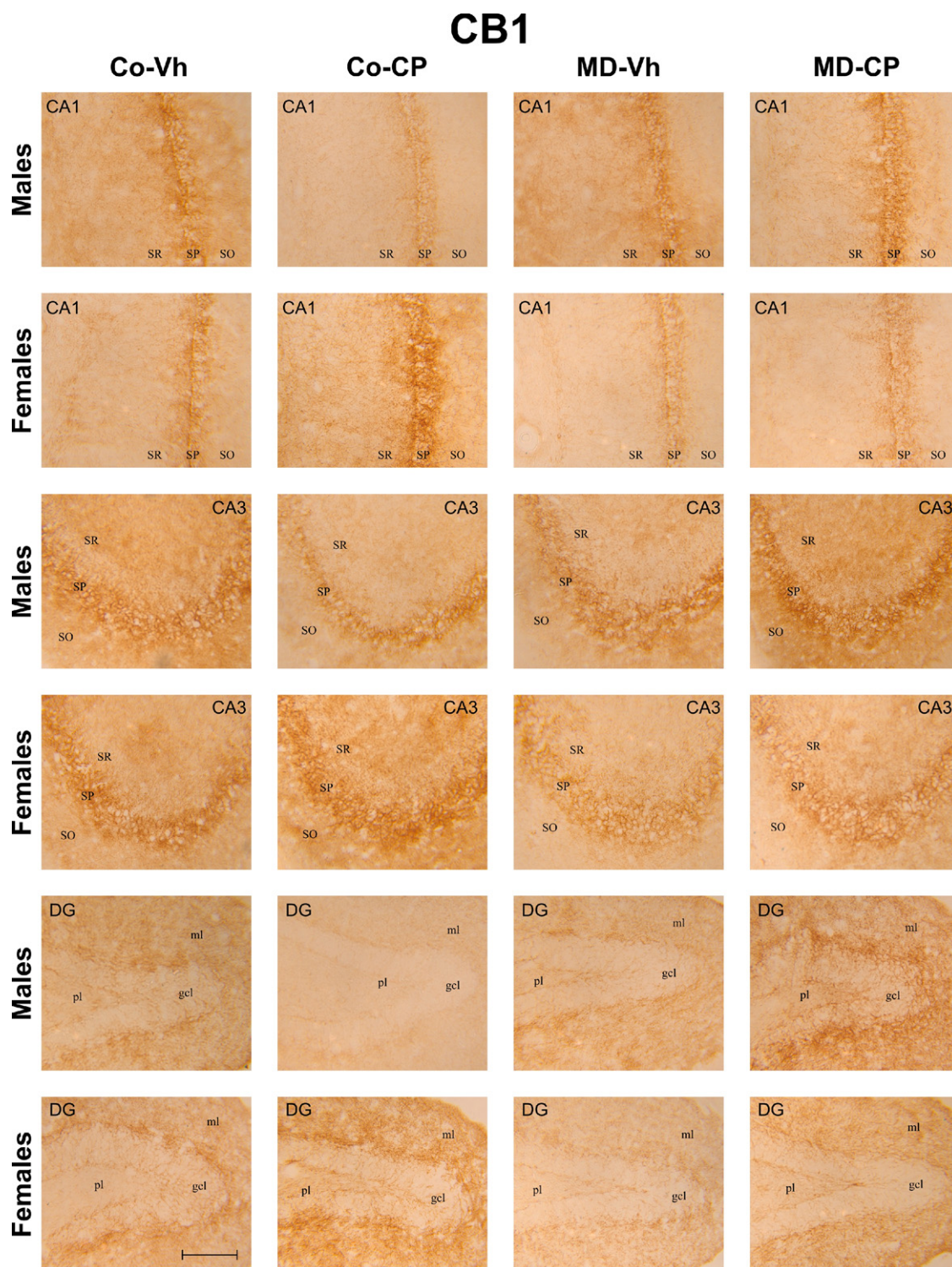


Fig. 4. Representative microphotographs of CB1 immunoreactivity after maternal deprivation (MD) and adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940 (CP) in CA1, and CA3 of Ammon's Horn and in the Dentate Gyrus (DG) of the hippocampal formation of adult male and female rats. Scale bar 5 μ m. MD, maternal deprivation; Co, control non MD animals; Vh, vehicle (see text); CP, CP 55,940; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; gcl, granular cell layer; ml, molecular layer; pl, polymorphic layer.

astrocytes described by Sofroniew (2009) is an upregulation of GFAP expression. This could make it possible to detect astrocytes that would otherwise remain under the

level of detection by immunohistochemistry in control rats. Therefore, part of the differences detected in the number of GFAP+ immunoreactive cells may reflect modifications in

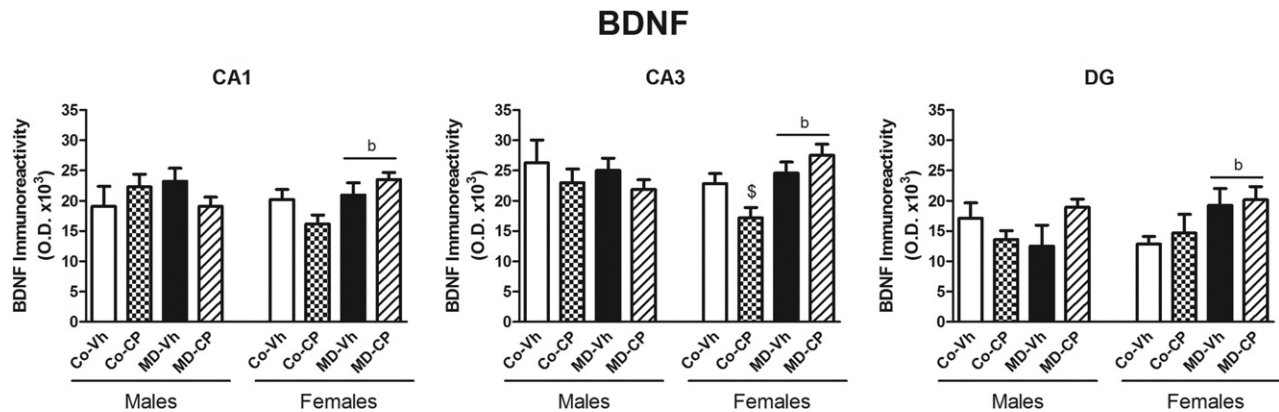


Fig. 5. Effects of maternal deprivation (MD) and/or adolescent exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 on hippocampal BDNF expression of adult male and female rats. Quantification of BDNF immunoreactivity was carried out in CA1, and CA3 areas of Ammon's Horn and in the Dentate Gyrus (DG). Histograms represent the mean \pm SEM of six animals per experimental group. MD, maternal deprivation; Co, control non MD animals; Vh, vehicle (see text); CP, CP 55,940. ANOVA ($P < 0.05$); b, significant overall effect of maternal deprivation. Significant differences, $P < 0.05$: \$ vs. CoVh female.

astrocyte reactivity, rather than number in response to neuronal cell death.

Human studies indicate that young cannabis users are more likely to use psychostimulants, hallucinogens or opioids than those who have never used cannabis (Ferguson et al., 2006), and experimental models have revealed that cannabinoids might induce lasting neuronal alterations that could affect the stimulant and/or reinforcing values of other drugs of abuse (Pistis et al., 2004; Ellgren et al., 2007). Interestingly, astrocytes have been implicated in the development of the rewarding effects and the drug dependence (Narita et al., 2008). It is tempting to speculate that the changes in GFAP+ hippocampal cells found in the present study might be related to this phenomenon. In relation to these relationships, endocannabinoids have been shown to activate reward-related feeding and to promote astrocytic differentiation (Higuchi et al., 2010).

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) proteomic analysis conducted on $\Delta 9$ -THC-treated hippocampal samples revealed several proteins showing long-lasting alterations in response to THC administration. The greater number of differentially expressed protein spots in adolescent $\Delta 9$ -THC pretreated rats compared with adult $\Delta 9$ -THC-pretreated rats suggests a greater vulnerability to lasting effects of $\Delta 9$ -THC in the former group. Differentially expressed proteins in adolescent $\Delta 9$ -THC exposed rats included cytoskeletal and other structural proteins, including transgelin-3 (NP25), α - and β -tubulin and myelin basic protein (MBP) (Quinn et al., 2008). This may be linked to structural changes or remodeling occurring after $\Delta 9$ -THC exposure in adolescents and is consistent with observations of cytoarchitectural changes occurring with cannabinoid treatment (Tagliaferro et al., 2006) and other reports of altered expression of the structural-related proteins tubulin and actin (Tahir et al., 1992; Wilson et al., 1996). As a whole, differentially expressed proteins in the hippocampus of $\Delta 9$ -THC preexposed adolescents have a variety of functions broadly related to oxidative stress, mitochondrial and metabolic function and regulation of the cytoskeleton

and signaling. The present data show that adolescent CP exposure tended to reduce BDNF expression in CA1 and CA3 of females, which is in line with the above results. In fact, BDNF exerts potent effects on neuronal function and survival and is important in maintaining dendritic morphology and synaptic function (Nagahara and Tuszynski, 2011). In turn, maternal deprivation counteracted the influence of CP and increased BDNF in females. Previous data about the effects at adulthood of maternal deprivation/separation procedures on hippocampal BDNF functioning are conflicting. Although most of the studies have described a decrease in BDNF mRNA or protein levels (Roceri et al., 2002; Lippmann et al., 2007; Aisa et al., 2009; de Lima et al., 2011), in other cases no changes have been detected (Roceri et al., 2004; Choy et al., 2008; Réus et al., 2011) and even an increase in BDNF protein levels without changes in BDNF mRNA have been described (Greisen et al., 2005). We have previously found (Valero et al., 2011) that, at adolescence, MD, per se, decreased BDNF in the hippocampus. However, in this case the measurement was performed at adulthood and the animals received chronic injections, which may have contributed to counteract the effect of MD. It is also likely that the increase in BDNF in the adulthood is a compensatory effect.

As a whole, the results suggest that male hippocampal astrocytes were more vulnerable than females to the effects of MD and juvenile cannabinoid treatment on hippocampal astrocytes. This finding suggests the existence of protective mechanisms in females. Previous studies in adult rats have identified sexual dimorphisms relating to the effects of stress on the hippocampus and amygdala, with males being more vulnerable. These differences may depend on the protective effects of circulating gonadal hormones in females and/or on organizational developmental effects of gonadal steroids (Cooke et al., 1998; McEwen, 2007). Interestingly, sexual dimorphisms have been reported for the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia with adult male rats showing more pronounced deficits in social behavior, grooming and water-maze learning than

females (Silva-Gómez et al., 2003). Thus, female developmental neuroprotective mechanisms may have their functional correlate at the behavioral level in the long-term. We cannot rule out that the present sex differences are indicative of a different timing in the cellular effects of MD and CP in both sexes. Moreover, our results indicate a different vulnerability of different subregions within the hippocampus to both types of manipulations. The results obtained in the animals receiving the two treatments, that is, MD and the adolescent chronic cannabinoid agonist indicate functional interactions between the two types of manipulations. For instance, in CA3 areas and in the polymorphic layer of the DG, treatment with CP tended to counteract the effect of MD. Intriguingly, both treatments, when administered separately induced changes that go in the same direction whereas the combination of both manipulations appeared to lead to “normalization”.

A relevant finding of the present study is the occurrence of sex differences in CB1 receptor immunoreactivity among the control (vehicle-injected, non MD) animals, with control females showing lower CB1 receptor immunoreactivity in diverse areas of the hippocampal formation. Previous studies using Western blot analysis also indicated a sex difference in hippocampal CB1 levels with males having higher CB1 levels than females (Reich et al., 2009). MD induced a decrease in CB1 expression in adult males and females. We have previously shown that this same MD procedure (24 h MD at PND 9) induced a short-term (PND 13) reduction in hippocampal CB1 receptors in males but not females. The present data demonstrate that the effect of MD in males is long lasting. Moreover, whereas females were not affected by MD in infancy (PND 13) (Llorente et al., 2009; Viveros et al., 2009), adult MD female animals do show a decrease in their hippocampal CB1 expression. This fact might be attributable to a differential developmental profile of hippocampal CB1 cannabinoid receptors in male and female rats, suggesting that an accurate interpretation of sexual dimorphisms, at least for certain parameters requires a broad and dynamic perspective rather than a single observation at one age. In turn, adolescent cannabinoid exposure induced, in non deprived males, a general decrease in CB1 immunoreactivity in adulthood that was most marked in CA1 and in the polymorphic layer of the DG. This long-lasting decrease in CB1 receptor immunoreactivity in CP males may represent a mechanism of adaptation, which was not present in females. These data appear to be in agreement with our previous behavioural results obtained with the same animals used in this study (Llorente-Berzal et al., 2011). In this earlier report we found that females were in general more affected at adulthood by the adolescent cannabinoid treatment (reduction of the pre-pulse inhibition of the acoustic startle response reflex and increase in novelty-seeking/exploration measures in the holeboard). Interestingly, male animals receiving MD and adolescent CP exhibited a “normalization” of hippocampal CB1 expression. In line

with the results obtained with GFAP, these data point to the existence of functional interactions between neonatal MD and adolescent cannabinoid exposure. In contrast to the effect observed in males, nondeprived CP treated females tended to show an increase of hippocampal CB1 immunoreactivity. Relevant to this latter result, it has been very recently shown that chronic adolescent $\Delta 9$ -THC interacted with ovarian hormones to produce persistent behavioral disruptions in female rats responding under an operant task comprised of both, learning and performance components as well as persistent alterations in CB1 receptor levels (Western blot). A primary example of these interactive effects occurred in the hippocampus where CB1 receptor density was significantly increased by $\Delta 9$ -THC administration during adolescence (a result that coincides with our present data) but not if $\Delta 9$ -THC administration was preceded by ovariectomy (Winsauer et al., 2010), indicating that the effect of adolescent THC on hippocampal CB1 receptors required ovarian hormones.

A large number of sex differences have been revealed in this study that deserves a final comment. In the original organizational–activational hypothesis of brain sexual differentiation, exposure to steroid hormones early in development masculinizes and defeminizes neural circuits (structural changes), programming behavioral responses to hormones in adulthood. Upon gonadal maturation during puberty, testicular and ovarian hormones act on previously sexually differentiated circuits to facilitate expression of sex-typical behaviours (activational effects) (Handa et al., 2008; Schwarz and McCarthy, 2008). Recently, it has been proposed that the remodeling adolescent brain is organized a second time by gonadal steroid hormones secreted during puberty. This second wave of brain organization would build on and refine circuits that were sexually differentiated during early neural development. If, in fact, steroid-dependent organization of behaviour occurs during adolescence, this prompts a reassessment of the developmental time-frame within which organizational effects are possible (Schulz et al., 2009). Regarding the present study, adolescent cannabis may have interfered with the reorganization mediated by the second wave.

CONCLUSIONS

In conclusion, in males MD induced a significant increase in the number of GFAP+ cells in CA1 and CA3 areas and in the polymorphic layer of the DG. In these latter two regions CP treatment tended to counteract the effect of MD. The treatment with CP induced, in control non-deprived males, a significant increase in the number of GFAP+ cells in the polymorphic layer of the DG. As a whole, these results suggest that males were more vulnerable than females to the effects of MD and juvenile cannabinoid treatment on hippocampal astrocytes. As for CB1 cannabinoid receptors, MD induced a decrease in CB1 expression in both, males and females. Adolescent cannabinoid exposure induced in non deprived males a gen-

eral decrease in CB1 immunoreactivity that was most marked in CA1 and in the polymorphic layer of the DG. In contrast, nondeprived CP treated females tended to have increased hippocampal CB1 immunoreactivity. Male animals receiving the two treatments showed a certain “normalization” of hippocampal CB1 expression, indicating functional interactions between neonatal MD and adolescent cannabinoid exposure. As for BDNF this interaction was also observed since the trend of CP treatment to decrease BDNF was counteracted by MD. The data support the idea that astrocytes and CB1 receptors are crucial targets for long-lasting effects of both early-life stress and adolescent cannabis use, and encourage further research on the pathophysiological significance of these phenomena. Endocannabinoids promote astroglial differentiation through the activation of CB1 receptors (Aguado et al., 2006) and mediate neuron–astrocyte communication (Navarrete and Araque, 2008). The present results further highlight the potential functional importance of astrocytes and its interaction with the endocannabinoid system in relation to long-term consequences of adolescent cannabis exposure and highlight the urgent need of a deeper investigation of the functional significance of long-term changes in hippocampal CB1 receptors and astrocytes after adolescence cannabinoids exposure.

Acknowledgments—This research has been sponsored by grants to M.P.V.: Plan Nacional sobre Drogas Orden SAS/1250/2009, Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud (ISCIII y FEDER): Red de trastornos adictivos (RD06/0001/1013), and GRUPOS UCM-BSCH (GRUPO UCM 951579), and by grants to A.A. and R.N.: Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01175), Red de trastornos adictivos (RD06/0001/0015), and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16) as well as to K.M.: the NIH (DA011322 and DA021696).

REFERENCES

- Adriani W, Laviola G (2004) Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* 15:341–352.
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006) The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 26:1551–1561.
- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2009) Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 19:1222–1231.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodríguez de Fonseca F (2010) The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav* 95:375–382.
- Biscaia M, Fernández B, Higuera-Matas A, Miguéns M, Viveros MP, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2008) Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55,940 on morphine self-administration behaviour and the endogenous opioid system. *Neuropharmacology* 54:863–873.
- Biscaia M, Marin S, Fernandez B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, Viveros MP (2003) Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 170:301–308.
- Choy KH, de Visser Y, Nichols NR, van den Buuse M (2008) Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus* 18:655–667.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM (1998) Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19:323–362.
- Cota D (2008) The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 20:35–38.
- de Lima MN, Presti-Torres J, Vedana G, Alcalde LA, Stertz L, Fries GR, Roesler R, Andersen ML, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N (2011) Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated D-amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 224:100–106.
- Di Forti M, Morrison PD, Butt A, Murray RM (2007) Cannabis use and psychiatric and cognitive disorders: the chicken or the egg? *Curr Opin Psychiatry* 20:228–234.
- Egertová M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422:159–171.
- Ellenbroek BA, de Bruin NM, van Den Kroonenburg PT, van Luijckelaar EL, Cools AR (2004) The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biol Psychiatry* 55:701–707.
- Ellenbroek BA, Riva MA (2003) Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clin Neurosci Res* 3:297–302.
- Ellgren M, Spano SM, Hurd YL (2007) Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 32:607–615.
- Eng LF, Ghinikar RS (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229–237.
- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ (2006) Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction* 101:556–569.
- Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Nunez L, Ellenbroek BA, Rodríguez de Fonseca F (2009) Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 206:531–549.
- Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wörtwein G (2005) Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res* 79:772–778.
- Handa RJ, Pak TR, Kudwa AE, Lund TD, Hinds L (2008) An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Horm Behav* 53:741–752.
- Hatton WJ, von Bartheld CS (1999) Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol* 409:169–186.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932–1936.
- Higuchi S, Irie K, Mishima S, Araki M, Ohji M, Shirakawa A, Akitake Y, Matsuyama K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2010) The cannabinoid 1-receptor silent antagonist O-2050 attenuates preference for high-fat diet and activated astrocytes in mice. *J Pharmacol Sci* 112:369–372.
- Higuera-Matas A, Botreau F, Miguéns M, Del Olmo N, Borcel E, Pérez-Alvarez L, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2009) Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 93:482–490.
- Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, del Olmo N, Miguéns M, Torres I, Vaquero JJ, Sánchez J, García-Lecumberri C, Desco M, Ambrosio E (2008) Augmented acquisition of cocaine self-admin-

- istration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence. *Neuropsychopharmacology* 33:806–813.
- Keimpema E, Mackie K, Harkany T (2011) Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci* 32:551–561.
- Laviola G, Marco EM (2011) Passing the knife edge in adolescence: brain pruning and specification of individual lines of development. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1631–1633.
- Lawston J, Borella A, Robinson JK, Whitaker-Azmitia PM (2000) Changes in hippocampal morphology following chronic treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Brain Res* 877:407–410.
- Levine S (2005) Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30:939–946.
- Leweke FM, Koethe D (2008) Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol* 13:264–275.
- Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995) Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 119:282–290.
- Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM (2007) Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25:3091–3098.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:636–650.
- Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci* 27:233–241.
- Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, López-Gallardo M, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Dev Neurobiol* 68:1334–1347.
- Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, Lopez-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, Nadal R (2011) Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16:624–637.
- López-Gallardo M, Llorente R, Llorente-Berzal A, Marco EM, Prada C, Di Marzo V, Viveros MP (2008) Neuronal and glial alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Dev Neurobiol* 68:1429–1440.
- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: *Cannabinoids handbook of experimental pharmacology*, Vol. 168 (Pertwee RG, ed), pp 299–323. Berlin: Springer.
- Macri S, Laviola G (2004) Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behav Brain Res* 154:231–238.
- Marco EM, Adriani W, Canese R, Podo F, Viveros MP, Laviola G (2007) Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86:334–345.
- Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, Llorente R, Castelli M, Viveros MP (2010) Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB1 cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol*; Epub ahead of print.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873–904.
- Moffett MC, Vicentic A, Koziel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73:321–330.
- Moreira FA, Lutz B (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13:196–212.
- Nagahara AH, Tuszynski MH (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10:209–219.
- Narita M, Suzuki M, Kuzumaki N, Miyatake M, Suzuki T (2008) Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: differences between methamphetamine and morphine. *Ann N Y Acad Sci* 1141:96–104.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57:883–893.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London, UK: Elsevier.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (2004) Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry* 56:86–94.
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, Thompson MR, Dawson B, Mallet PE, Kashem MA, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor IS (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33:1113–1126.
- Reed MG, Howard CV (1998) Surface-weighted star volume: concept and estimation. *J Microsc* 190:350–356.
- Reich CG, Taylor ME, McCarthy MM (2009) Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. *Behav Brain Res* 203:264–269.
- Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J (2011) Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res* 36:460–466.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci* 9:1526–1533.
- Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA (2004) Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* 55:708–714.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002) Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7:609–616.
- Rodríguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnín A, Fernández-Ruiz JJ (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4:135–138.
- Romeo RD (2003) Puberty: a period of both organizational and activation effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 15:1185–1192.
- Rubino T, Vigano D, Realini N, Guidali C, Braidà D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D (2008) Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33:2760–2771.
- Schneider M (2008) Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addict Biol* 13:253–263.
- Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL (2009) Back to the future: the organizational-activation hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* 55:597–604.

- Schwarz JM, McCarthy MM (2008) Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J Neurochem* 105:1561–1572.
- Sewell RA, Ranganathan M, D'Souza DC (2009) Cannabinoids and psychosis. *Int Rev Psychiatry* 21:152–162.
- Silva-Gómez AB, Bermúdez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G (2003) Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res* 973:285–292.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417–463.
- Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19:623–632.
- Suárez J, Rivera P, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Res* 1349:162–173.
- Sundram S (2006) Cannabis and neurodevelopment: implications for psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol* 21:245–254.
- Tagliaferro P, Javier Ramos A, Onaivi ES, Evrard SG, Lujilde J, Brusco A (2006) Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Brain Res* 1085:163–176.
- Tagliaferro P, Ramos AJ, López EM, Pecci Saavedra J, Brusco A (1997) Neural and astroglial effects of a chronic parachlorophenylalanine-induced serotonin synthesis inhibition. *Mol Chem Neuropharmacol* 32:195–211.
- Tahir SK, Trogadis JE, Stevens JK, Zimmerman AM (1992) Cytoskeletal organization following cannabinoid treatment in undifferentiated and differentiated PC12 cells. *Biochem Cell Biol* 70:1159–1173.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, Wilkinson CW, Carpenter LL (2008) Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Biol Psychiatry* 63:1147–1154.
- Valero M, Marco EM, De La Serna O, Borcel E, Llorente R, Ramirez MJ, Viveros MP (2011) Detrimental cognitive effects of early maternal deprivation in adolescent male and female rats. Putative underlying mechanisms. In: 8th IBRO World Congress of Neuroscience Florence.
- Viveros MP, Llorente R, López-Gallardo M, Suarez J, Bermúdez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl 1):S217–S226.
- Viveros MP, Llorente R, Suarez J, Llorente-Berzal A, Lopez-Gallardo M, Rodriguez de Fonseca F (2011b) The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol*; Epub ahead of print.
- Viveros MP, Marco EM, File SE (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 331–342.
- Viveros MP, Marco EM, Llorente R, Lopez-Gallardo M (2007) Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast* 2007:52908.
- Viveros MP, Marco EM, Lopez-Gallardo M, Garcia-Segura LM, Wagner EJ (2011a) Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1740–1751.
- Wegener N, Koch M (2009) Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res* 1253:81–91.
- Wilson RG Jr, Tahir SK, Mechoulam R, Zimmerman S, Zimmerman AM (1996) Cannabinoid enantiomer action on the cytoarchitecture. *Cell Biol Int* 20:147–157.
- Winsauer PJ, Daniel JM, Filipeanu CM, Leonard ST, Hulst JL, Rodgers SP, Lassen-Greene CL, Sutton JL (2010) Long-term behavioral and pharmacodynamic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in female rats depend on ovarian hormone status. *Addict Biol* 16:64–81.
- Wotjak CT (2005) Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* 5:659–670.

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

Los presentes resultados muestran que ambos, la SM temprana y la exposición adolescente al agonista cannabinoide CP causaron diversas modificaciones sexo-dependientes a largo plazo. Además, se observaron interacciones funcionales de ambos tratamientos sobre los niveles de GFAP, de receptores CB1 y de BDNF hipocampales.

Este es el primer estudio que proporciona una medida sistemática del comportamiento materno tras este procedimiento específico de separación materna, y en concreto encontramos que la SM causó un aumento del comportamiento materno.

A nivel conductual la SM causó en ratas macho un incremento significativo del tiempo pasado en las áreas abiertas del LCE. La SM en las presentes condiciones no produjo una alteración de la capacidad de PPI en ninguno de los sexos. Es posible que los efectos deletéreos de la SM sobre este parámetro hayan sido de alguna manera revertidos por la manipulación a la que los animales fueron sometidos para su pesado e inyección durante el periodo adolescente. El tratamiento adolescente con CP, sin embargo, sí que causó una disminución de la PPI, cuando la intensidad del prepulso fue de 80 dB, en hembras adultas, aunque no en machos. Igualmente en hembras, el tratamiento con CP produjo un aumento del comportamiento exploratorio (*head-dipping*) y una disminución de las conductas de ansiedad (aumento de la deambulación interna) en el TCA.

Respecto al eje HHA, el tratamiento adolescente con CP provocó un incremento de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y corticosterona en respuesta a la prueba de la PPI en machos, mientras que no se vio ningún efecto del CP en la respuesta del eje HHA en las hembras.

En resumen, en lo concerniente al estudio de comportamiento y respuesta al estrés, en machos, la SM parece reducir la ansiedad o incrementar el comportamiento de toma de riesgos mientras que la exposición adolescente a compuestos cannabinoideos no tuvo importantes efectos conductuales pero sí causó un aumento de la respuesta del eje HHA a un estrés de nivel moderado. En hembras, la SM no produjo ningún efecto, pero

la exposición adolescente a un compuesto cannabinoide puede haber promovido que muestren en durante la etapa adulta conductas de búsqueda de la novedad y un déficit de la atención.

La administración de CP durante la adolescencia disminuyó la ganancia de peso corporal durante el periodo del tratamiento tanto en machos como en hembras. La SM, por su parte, también causó una disminución a largo plazo del peso corporal. Posiblemente relacionado con esto último, las ratas SM adultas de ambos sexos mostraron una reducción de los niveles plasmáticos de leptina.

En cuanto a los efecto de los tratamientos sobre los parámetro analizados por inmunohistoquímica, los presentes resultados muestran que tanto la SM como la exposición adolescente a un compuesto cannabinoide causaron efectos sexo-dependientes y a largo plazo sobre los niveles de GFAP, de receptores CB1 y de BDNF hipocampales.

En el estudio inmunohistoquímico del GFAP hipocampal, encontramos que las hembras control adultas presentaron un mayor número basal de células de glía GFAP+ en la capa celular polimórfica del giro dentado (GD) que los correspondientes machos.

La SM causó en los machos un incremento significativo del número de células GFAP+ en las áreas CA1, CA3 y en la capa polimórfica del GD. En estas dos últimas regiones el tratamiento con CP tuvo una tendencia a contrarrestar los efectos de la SM. El tratamiento con un compuesto cannabinoide durante la adolescencia también causó, en machos control no-SM, un aumento significativo del número de células GFAP+ en la capa polimórfica del GD. Estos resultados sugieren que los machos fueron más vulnerables que las hembras a los efectos de la SM y al tratamiento juvenil con el compuesto cannabinoide sobre los astrocitos hipocampales.

Un importante hallazgo del presente estudio es la aparición de diferencias sexuales en la inmunorreactividad al receptor CB1 entre los animales control (tratados con vehículo y no-SM), mostrando las hembras una menor inmunorreactividad al receptor CB1 en diversas áreas de la región hipocampal.

La SM causó una disminución de la expresión de CB1 en machos y hembras adultos. A su vez, la exposición a un compuesto cannabinoide durante la adolescencia causó, en machos no-SM, una disminución general de la inmunorreactividad a CB1 en la edad adulta que fue más marcada en CA1 y en la capa polimórfica del GD. En contraste, las hembras no-SM tratadas con CP mostraron una tendencia a incrementar la inmunorreactividad a CB1 en el hipocampo. Los animales macho que recibieron los dos tratamientos mostraron una cierta “normalización” de la expresión de CB1 en el hipocampo, indicativo de interacciones funcionales entre la SM neonatal y la exposición adolescente al compuesto cannabinoide. Con respecto al BDNF, también observamos una tendencia a interacción entre tratamientos. Así, la exposición adolescente a CP tendió a reducir la expresión de BDNF en CA1 y CA3 de hembras mientras que la SM contrarrestó la influencia del CP e incrementó el BDNF hipocampal.

En conjunto, los resultados presentados en este primer capítulo sugieren que tanto experiencias estresantes durante la infancia como la exposición a cannabis durante la adolescencia pueden producir efectos a largo plazo sobre las conductas cognitivas y emocionales. Por otra parte, los datos inmunohistoquímicos aquí aportados apoyan la idea de que las células gliales, en particular los astrocitos, y los receptores CB1 constituyen dianas relevantes respecto a los efectos a largo plazo de ambos tipos de tratamientos.

La separación materna modula la preferencia condicionada de lugar a MDMA de una manera sexo-dependiente. Correlatos neuroquímicos

La separación materna (SM) produce alteraciones en la vulnerabilidad a diferentes drogas de abuso, tales como la cocaína (Matthews *et al.*, 1999; Moffet *et al.*, 2006) y la anfetamina (Campbell y Spear, 1999). A su vez, el período adolescente se ha asociado con un incremento del riesgo a desarrollar problemas relacionados con las drogas de abuso (Bava y Tapert, 2010), y su correlato en roedores, es decir, el período análogo al periaadolescente en humanos, se considera como un modelo útil para el estudio de los factores de riesgo asociados con una elevada vulnerabilidad a las drogas en estas edades (Schramm-Sapota *et al.*, 2009). En relación a los efectos de la SM sobre la vulnerabilidad a drogas de abuso, particularmente psicoestimulantes, durante la adolescencia, los estudios son relativamente escasos. Faure *et al.* (2009) observaron que ratas macho adolescentes que habían sido sometidas a SM [3 horas diarias entre los días postnatales (DP) 2-14] no mostraron cambios en la susceptibilidad a metanfetamina y en un estudio más reciente se ha observado que ratones macho adolescentes a los que se les realizó un solo episodio de SM (24 horas a DP 12) mostraron alteraciones en la adquisición de la autoadministración de cocaína (Martini y Valverde, 2012).

El éxtasis (MDMA, 3,4-metilendioximetanfetamina), es una droga recreativa con propiedades psicoestimulantes normalmente consumida por adolescentes (EMCDDA, 2012). La MDMA produce efectos gratificantes en roedores adolescentes en el paradigma de la preferencia condicionada de lugar (CPP; del inglés *Conditioned place preference*; Catlow *et al.*, 2010; Manzanedo *et al.*, 2010; Daza-Losada *et al.*, 2007), que consiste en un condicionamiento de tipo pavloviano que asocia un ambiente específico con los efectos farmacológicos de una droga, y un ambiente distinto con la ausencia de la droga. Típicamente, los animales prefieren el ambiente asociado con las drogas de abuso usadas por humanos (Aguilar *et al.*, 2009; Tzschenke, 1998). Se ha visto que existe una gran cantidad de diferencias sexuales con respecto a los efectos de la MDMA en roedores (Wallinga *et al.*, 2011; Fonsart *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2007;

Koenig *et al.*, 2005; Páleníček *et al.*, 2005;). En el presente estudio hemos evaluado la posible influencia moduladora de la SM sobre los efectos gratificantes de la MDMA en ratas adolescentes de ambos sexos. También hemos evaluado los efectos de la SM en el comportamiento de las mismas ratas en el campo abierto al llegar a la etapa adulta. El campo abierto permite medir conductas relacionadas con emotividad/ansiedad (Valle y Bols, 1976; Gray, 1987).

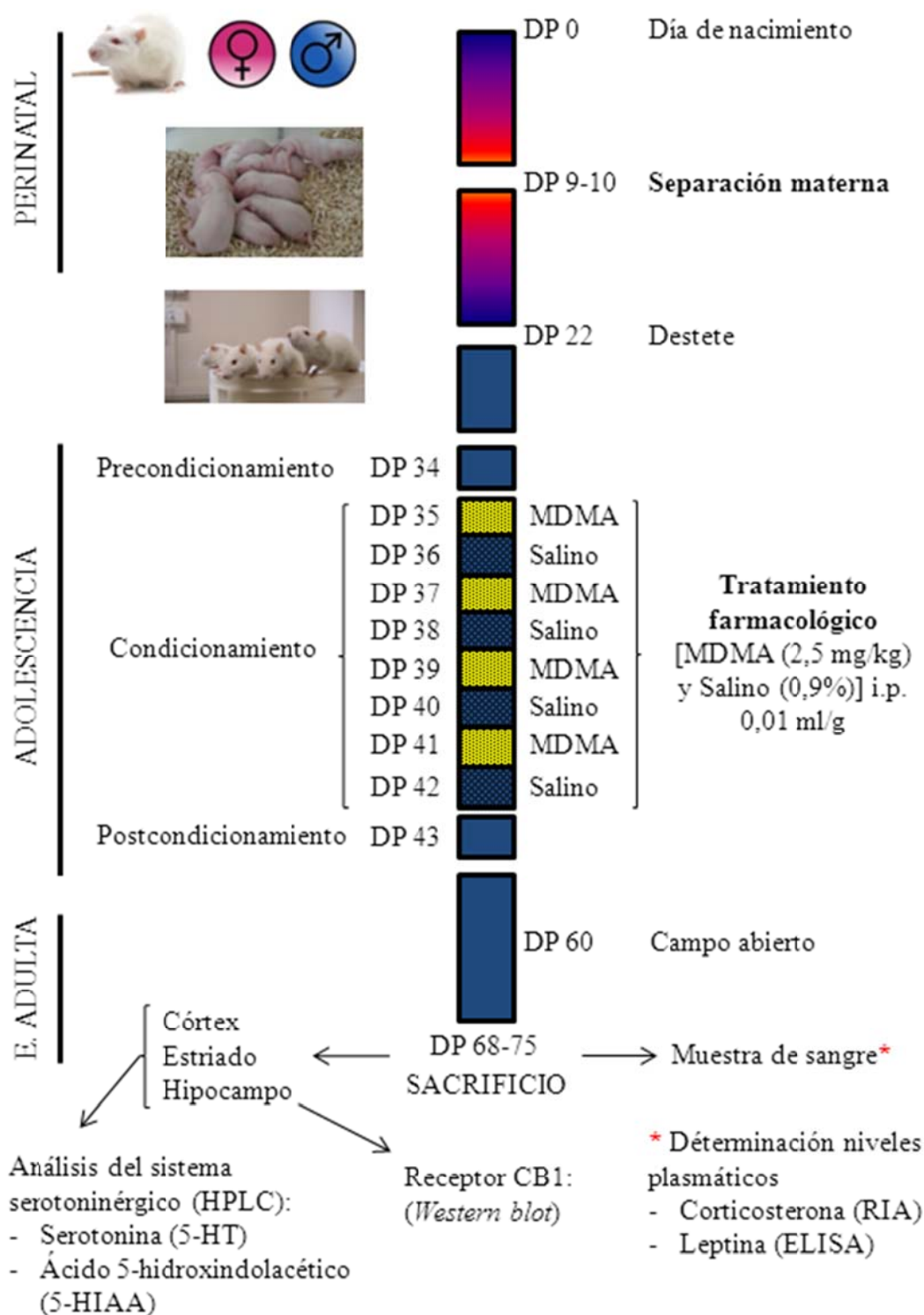
Hay una gran variedad de neurotransmisores que parecen estar involucrados en los efectos gratificantes de la MDMA, particularmente la dopamina (Vidal-Infer *et al.*, 2012) y la serotonina (Bilsky y Reid, 1991). La MDMA, principalmente, produce una liberación de serotonina presináptica, y en menor medida de norepinefrina y dopamina (Schmidt *et al.*, 1987). Se ha visto que esta droga tiene una alta afinidad por el transportador de serotonina y una afinidad moderada por los receptores serotoninérgicos postsinápticos 5-HT₂ (Battaglia *et al.*, 1988). Es más, varios estudios preclínicos han mostrado que un tratamiento a corto plazo con MDMA puede causar una pérdida a largo plazo o incluso permanente de neuronas serotoninérgicas funcionales como puede constatarse por la disminución de los niveles de serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Battaglia *et al.*, 1987; Sarkar y Schmued, 2010). Existe un alto número de evidencias del papel del sistema endocannabinoide (SEC) en los efectos gratificantes de la MDMA (Braidá *et al.*, 2005; Manzanedo *et al.*, 2010; Daza-Losada *et al.*, 2011). Por otro lado, la MDMA causa efectos endocrinos que todavía no están bien caracterizados, pero que son relevantes para el estudio de las propiedades adictivas de las drogas de abuso, tales como alteraciones en los niveles de corticosterona y leptina (Shalev *et al.*, 2010). El consumo de MDMA produce a corto plazo un aumento de los niveles de corticosterona (Graham *et al.*, 2010; Ferraz-de-Paula *et al.*, 2011) y causa una disminución transitoria de los niveles serológicos de leptina (Kobeissy *et al.*, 2008).

Como ya hemos comentado en el capítulo anterior, en los últimos años hemos caracterizado un modelo específico de SM en el cual las ratas son sometidas a un solo episodio de SM de 24 horas a día postnatal (DP) 9. Durante la adolescencia y/o la etapa adulta, las ratas SM exhiben conductas de tipo depresivo, alteraciones de las respuestas locomotoras, una elevada impulsividad y respuestas alteradas a un agonista cannabinoide (Llorente *et al.*, 2007; Marco *et al.*, 2009), alteraciones en la función del

eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) (Llorente *et al.*, 2007; Llorente-Berzal *et al.*, 2012), una expresión disminuida del receptor CB1 en el hipocampo (Llorente-Berzal *et al.*, 2012; López-Gallardo *et al.*, 2012), unos menores niveles circulantes de leptina (Llorente *et al.*, 2011), marcadas modificaciones en el sistema serotoninérgico de diversas regiones cerebrales (Llorente *et al.*, 2010) y una plasticidad sináptica alterada (Marco *et al.*, 2012). Además, hemos descrito numerosas diferencias sexuales en cuanto a los efectos de este modelo de SM (Llorente-Berzal *et al.*, 2012; Llorente *et al.*, 2011; Viveros *et al.*, 2009).

Considerando que ambas, la SM y la MDMA, parecen afectar algunos parámetros en común y en diversos casos de una forma sexo-dependiente, quisimos estudiar los efectos moduladores de la SM no sólo sobre los efectos gratificantes de la MDMA, sino también sobre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide y en los niveles circulantes de corticosterona y leptina en ratas jóvenes de ambos sexos.

DISEÑO EXPERIMENTAL





Sex-dependent effects of early maternal deprivation on MDMA-induced conditioned place preference in adolescent rats: Possible neurochemical correlates

Alvaro Llorente-Berzal^a, Carmen Manzanedo^c, Manuel Daza-Losada^c, Manuel Valero^a, Meritxell López-Gallardo^b, María A. Aguilar^c, Marta Rodríguez-Arias^c, José Miñarro^{c,*}, Maria-Paz Viveros^{a,**}

^a Depto. Fisiología (Fisiología Animal II), Fac Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Depto. Fisiología, Fac Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^c Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Depto. Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2012

Received in revised form 4 December 2012

Accepted 5 December 2012

Available online 14 December 2012

Keywords:

Maternal deprivation

Adolescence

Conditioned place preference

MDMA

Serotonergic system

CB₁ receptor

ABSTRACT

The early neonatal stage constitutes a sensitive period during which exposure to adverse events can increase the risk of neuropsychiatric disorders. Maternal deprivation (MD) is a model of early life stress that induces long-term behavioural and physiological alterations, including susceptibility to different drugs of abuse. In the present study we have used the conditioned place preference (CPP) paradigm to address the influence of MD on the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymetamphetamine (MDMA) in adolescent animals of both sexes. We have previously observed in adolescent rats that MD induces modifications in the serotonergic and endocannabinoid systems, which play a role in the rewarding effects of MDMA. In light of this evidence, we hypothesized that MD would alter the psychobiological consequences of exposure to MDMA. Neonatal Wistar rats underwent MD (24 h, on PND 9) or were left undisturbed (controls). The animals were conditioned with 2.5 mg/kg MDMA during the periadolescent period (PND 34–PND 43) and were tested in the open-field test at the end of adolescence (PND 60). Animals were sacrificed on PND 68–75 and levels of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid were measured in the striatum, hippocampus and cortex, while the expression of hippocampal CB₁ cannabinoid receptor (CB₁R) and circulating levels of corticosterone and leptin were also measured. Control males showed CPP after administration of MDMA. However, no MDMA-induced CPP was detected in control females or MD males, and MD had no effect on open field activity in any group. A reduction in striatal and cortical 5-HT levels, increased expression of hippocampal CB₁R and a marked trend towards higher circulating leptin levels were observed in MDMA-treated MD males. Our results demonstrate for the first time that MD reduces the rewarding effects of MDMA in a sex-dependent manner. We propose that this effect is related, at least in part, with alterations of the serotonergic and cannabinoid systems.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The early neonatal age constitutes a sensitive period with respect to responsiveness to external environmental factors. A large body of evidence supports the fact that insults during brain maturation can lead to neurophysiological and behavioural impairments related with the aetiology of major neuropsychiatric disorders (Beydoun and Saftlas, 2008). In rodent models, disruption of normal mother–infant interactions has been reported to produce changes in the neurobiology, physiology and emotional behaviour of adult animals (Marco et al., 2009; Viveros et al., 2009). Maternal deprivation (MD) induces alterations in vulnerability to different drugs of abuse, such as cocaine (Matthews et al., 1999; Moffett et al., 2006), and amphetamine (Campbell and Spear, 1999). Although

* Corresponding author at: Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Avenida Blasco Ibañez 21, 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 3864020; fax: +34 963864668.

** Corresponding author at: Departamento de Fisiología (Fisiol Anim II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid & Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3944993; fax: +34 91 3944935.

E-mail addresses: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro), pazviver@bio.ucm.es (M.-P. Viveros).

adolescence is a critical developmental period during which several psychiatric disorders emerge, the long-term neurobehavioural effects of MD on adolescent animals have been the subject of little study. Adolescence is also associated with an increased risk of drug-related problems (Bava and Tapert, 2010), and periadolescent rodents are considered a useful model for the study of risk factors associated with enhanced vulnerability to drugs in adolescent humans (Schramm-Sapota et al., 2009). The effects of MD on vulnerability to drugs of abuse during adolescence have been addressed by only two studies. In the first, adolescent male rats undergoing maternal separation (3 h daily on PND 2–14) did not show changes in their susceptibility to methamphetamine (Faure et al., 2009). In the second, adolescent male mice experiencing a single episode of MD (24-h on PND 12) showed impairment in their acquisition of cocaine self-administration (Martini and Valverde, 2012).

In recent years we have characterized a specific MD model by which rats are submitted to a single 24 h episode of MD on PND 9. During adolescence and/or adulthood, MD rats display depressive-like behaviours, altered locomotor responses, increased impulsivity and altered responses to a cannabinoid agonist (Llorente et al., 2007; Marco et al., 2009), alterations in the hypothalamus–pituitary–adrenal axis (HPA) function (Llorente et al., 2007; Llorente-Berzal et al., 2012, 2011), decreased CB₁ receptor expression in the hippocampus (Llorente-Berzal et al., 2012; López-Gallardo et al., 2012), lower circulating leptin levels (Llorente et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2011), marked modifications in the serotonergic system of diverse brain regions (Llorente et al., 2010) and altered synaptic plasticity (Marco et al., 2012). In addition, diverse MD-induced effects have been associated with sexual dimorphisms (Llorente et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2012; Viveros et al., 2009).

Ecstasy, or MDMA (3,4-methylenedioxy-methamphetamine), is a club drug with psychostimulant properties usually consumed by adolescents (EMCDDA, 2011). MDMA induces rewarding effects in adolescent rodents in the conditioned place preference (CPP) paradigm (Catlow et al., 2010; Daza-Losada et al., 2007; Manzanedo et al., 2010), which consists of a Pavlovian conditioning that pairs a specific environment with the pharmacological effects of a drug, and a different environment with the absence of the drug. Typically, animals prefer the environment that is paired with drugs abused by humans (Aguilar et al., 2009; Tzschentke, 1998). In the present study, we have addressed, for first time, the influence of MD on the rewarding effects of MDMA in adolescent rats in the CPP paradigm. Several sex differences have been reported regarding the effects of MDMA in rodents (Fonsart et al., 2009; Koenig et al., 2005; Pálenicek et al., 2005; Walker et al., 2007; Wallinga et al., 2011). However, potential sex differences in the rewarding effects of MDMA have not been studied until now. In the present study we have evaluated the possible modulatory influence of MD on the rewarding effects of MDMA in adolescent rats of both sexes. We have also evaluated the effects of MD on the behaviour of the same rats in a novel open field area on reaching adulthood. The open-field test allows anxiety-related behaviours to be measured by comparing the time spent by animals in the central area vs the periphery of the field (Gray, 1987; Valle and Bols, 1976).

Several neurotransmitters seem to be involved in the conditioned rewarding effects of MDMA, particularly dopamine (DA) (Vidal-Infer et al., 2012) and serotonin (5-HT) (Bilsky and Reid, 1991). MDMA mainly releases presynaptic 5-HT, and to a lesser extent norepinephrine and DA (Schmidt et al., 1987). This drug has been shown to have a high affinity for the 5-HT transporter and a moderate affinity for postsynaptic serotonergic 5-HT₂ receptors (Battaglia et al., 1988). Moreover, several preclinical studies have shown that short-term MDMA treatment can cause long-lasting and perhaps even permanent loss of brain serotonergic neuron functioning, as indicated by depletion of 5-HT and

5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels (Battaglia et al., 1987; Sarkar and Schmued, 2010). There is accumulating evidence for a role of the endocannabinoid system in the rewarding effects of MDMA (Braida et al., 2005; Daza-Losada et al., 2011; Manzanedo et al., 2010). On the other hand, MDMA exerts endocrine effects that are not yet well characterized, but which are relevant to the addictive properties of drugs of abuse, such as alterations in corticosterone or leptin levels (Shalev et al., 2010). MDMA induces a short-term increase of corticosterone levels (Ferraz-de-Paula et al., 2011; Graham et al., 2010) and causes a transient decrease in serum leptin (Kobeissy et al., 2008).

Considering that both MD and MDMA appear to affect diverse common parameters, we aimed to address the modulatory effect of MD not only on the rewarding effects of MDMA, but also on the effects of this drug on serotonergic and endocannabinoid systems and circulating levels of corticosterone and leptin. We hypothesized that a single episode of MD administered on PND 9 would alter the rewarding effects of MDMA on adolescent rats and their behaviour in the open-field during adulthood. We suspected that these behavioural effects are related with long-term alterations induced by MD in serotonin and 5-HIAA levels, hippocampal CB₁ receptor expression and plasmatic corticosterone and/or leptin levels. We also hypothesized that some of the behavioural or biochemical effects induced by MD are sex-dependent.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*) of both sexes were used in this study. Subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain), which were mated (one male + two females) approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at a constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) in a reversed 12 h dark/light cycle (lights on at 20:00 h), with free access to food (commercial diet for rodents Harlan Interfauna S.A., Barcelona, Spain) and water.

On the day of birth [postnatal day (PND) 0] litters were culled and sex balanced to eight pups per dam (four males and four females). On weaning day (PND 22), animals were separated by sex and housed four individuals per cage. A total of 22 litters were used, with experimental groups including animals from at least five different litters. The same rats were used in behavioural (CPP and open field) and biochemical (biogenic amines, corticosterone and leptin levels and CB₁ receptor Western blot assay) experiments (see Fig. 1). These studies were approved by the local ethics committee and complied with the Royal Decree 1201/2005 (BOE no. 252) pertaining to the protection of experimental animals and with the European Communities Council Directive 2010/63/UE.

2.2. Maternal deprivation

The MD protocol took place on postnatal day PND 9, as previously described (Llorente et al., 2007, 2010). In brief, half of the litters were submitted to 24 h of MD: dams were removed from their home-cages at 9.00 am and the pups were left undisturbed in their corresponding home-cage (in the same room) for 24 h. Dams were returned to their corresponding home-cages at 9.00 am on PND 10.

2.3. Drugs

All experimental groups received a 0.01 ml/g i.p. injection of 2.5 mg/kg of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine hydrochloride; Lipomed AG Laboratories, Switzerland) on PND 35, 37, 39 and 41, and the same volume of the corresponding vehicle, physiological saline (NaCl 0.9%), on PND 36, 38, 40 and 42.

2.4. Behavioural testing

2.4.1. CPP

For place conditioning, eight identical Plexiglas boxes with two equal-size compartments (30.7 cm length \times 31.5 cm width \times 34.5 cm height) separated by a grey central area (13.8 cm length \times 31.5 cm width \times 34.5 cm height) were used. The compartments have different coloured walls (black vs white) and distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one).

Four infrared light beams in each compartment of the box and six in the central area allowed the recording of the animal's position and its crossings from one compartment to the other. The equipment was controlled by two IBM PC computers and MONPRE 2Z software (CIBERTEC SA, Spain). On PND 34 (± 1) acquisition of the place conditioning procedure was initiated (see Fig. 1). The CPP, consisting of three

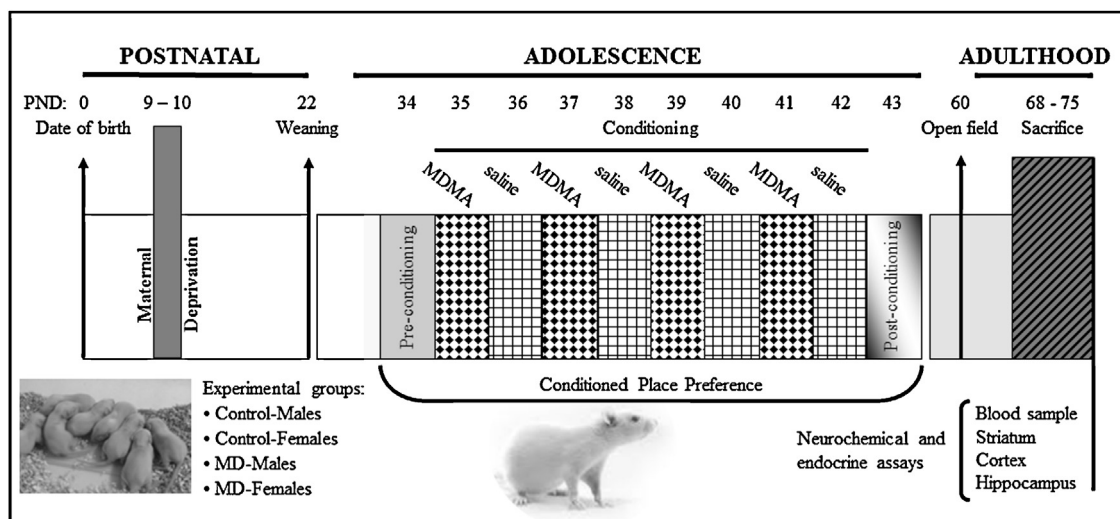


Fig. 1. Experimental design. Animals were deprived from their mother during 24 h on postnatal day (PND) 9. Animals were submitted to the conditioned place preference test from PND 34 until PND 43. During the conditioning phase, all groups were treated on different days with MDMA (PND 35, 37, 39, 41) or saline (PND 36, 38, 40, 42) (see text for more details). On PND 60, animals were subjected to the open field test and they were sacrificed between PND 68–75. The striatum, cortex and hippocampus were dissected and a blood sample was taken for subsequent neurochemical and endocrine assays.

phases, was carried out during the dark cycle (under dim illumination, <10 lx) following a procedure that is unbiased in terms of initial spontaneous preference (for more details see Daza-Losada et al., 2007). During the first phase, or pre-conditioning (Pre-C), rats were given access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) and the time spent by the animal in each compartment was recorded. Animals showing strong unconditioned aversion (–33% of the session time) or preference (+67%) for a given compartment were discarded from the rest of the procedure. In each group, half the animals received the drug or vehicle in one compartment and the other half in the other compartment. After assigning the compartments, an ANOVA revealed that there were no significant differences between the time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments during the Pre-C phase. In the second phase (conditioning), animals were conditioned with MDMA or saline through four pairings with the respective compartment. Animals underwent only one pairing per day: rats conditioned with MDMA received an injection of 2.5 mg/kg of MDMA immediately before confinement to the drug-paired compartment for 30 min on days 2, 4, 6, and 8 (PND 35, 37, 39, and 41) and received physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 30 min on days 3, 5, 7 and 9 (PND 36, 38, 40, and 42). The central area was never used during conditioning and access was blocked by guillotine doors. During the third phase, or post-conditioning (Post-C), on day 10 (PND 43) the guillotine doors separating the two compartments were removed and the time spent by the untreated rat in each compartment was recorded during a 900-s observation period. The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and that spent in the Pre-C test is a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive, then the drug is considered to have induced a preference for the drug-paired compartment, whereas the opposite indicates the induction of an aversion.

2.4.2. Open field

When MDMA-treated adolescent rats entered adulthood (PND 60), their emotionally related behaviour was evaluated in the open field test. The open field consisted of a square arena (56 cm length × 56 cm width × 60 cm height) divided into 16 equal parts delimiting two areas: the periphery and the centre (the central 4 parts). During the dark cycle, rats were placed in the open field, which was illuminated by a slight white light (40 lx), and their behaviour was videotaped for 8 min. Videotapes were evaluated by an observer who was blind to experimental conditions using a computer program to determine the time animals spent ambulating in the periphery and in the central area, latency to enter the centre of the apparatus, and time of rearings.

2.5. Tissue sampling

Animals were sacrificed by cervical fracture on PND 68–75. Within 2 min their brains were removed and placed on an ice-cold plate. The striatum, cortex and hippocampus were dissected following the procedure described by Heffner et al. (1980), and were then frozen on dry ice and stored at –80 °C. Blood samples were drawn from the trunk into vacuum blood collection tubes (Vacutest kima, Arzergrande, Italy), which were centrifuged (3000 rpm, 10 min, 4 °C) in order to obtain plasma for further analysis. Plasma was aliquotated and stored at –80 °C.

2.6. Analysis of biogenic amines

The striatum, cortex and hippocampus were thawed, weighed and then homogenized in 200 ml of perchloric acid (0.1 N) using ultrasounds. The homogenate was centrifuged at 24,147 × g for 30 min and the supernatant divided into aliquots for analysis of biogenic amines. Serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were analysed in a high performance liquid chromatograph (Agilent 1100 series HPLC). Samples were applied to a column (ZORBAX Eclipse XDB-C8 46 mm × 150 mm, 5 µm; Agilent Zorbax High Pressure Cartage Guard-column). A mobile phase consisting of 800 ml of a solution of sodium acetate (0.01 M), 500 ml of a solution of citric acid (0.01 M) ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA, 148 mg) and methanol (255 ml) was passed through the column at a constant flow of 1 ml/min. The HPLC was maintained at a constant temperature (21 ± 1 °C). Analytes were oxidized on a glassy carbon electrode maintained at 300 mV against an Ag/AgCl reference electrode (BAS). The complete separation of biogenic amines was achieved in 25 min. Data were collected and analysed using the Merck-Hitachi software package (Model D-7000). Levels of 5-HT and 5-HIAA (ng/mg of tissue) were analysed in the striatum, the hippocampus and the prefrontal cortex.

2.7. CB₁ receptor Western blot assay

Tissue samples were homogenized with 20 strokes at a ratio of 1:3 (w/v) in an ice-cold lysis-buffer (Hepes 10 mM pH=7.5; EGTA 10 mM; EDTA 10 mM; CINA 150 mM; CHAPS 2.5%) containing 5 mg/ml of a cocktail of protease inhibitors (Roche, Ref.: 11-836-170-001) and PMSF 0.1 M. The homogenate obtained was centrifuged at 14,000 rpm for 30 min and the supernatant then collected. The total protein concentration per sample was calculated using the MicroBradford reagent system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), quantified using a Multiskan FC microplate photometer (Thermo Fisher Technologies) with the Skanlt software for Multiskan FC, version 2.5. The samples were aliquoted and stored at –30 °C until use. The amount of protein loaded for each sample was determined from concentration–effect control gels (data not shown), various amounts of hippocampal protein were loaded into the control gel and analysed for CB₁ receptor protein levels. The amount of protein selected from the control gel to load into our test gels reflects the lowest possible amount that yielded a detectable, quantifiable band. All samples were balanced to 20 µg protein/gel lane and were then diluted (1:1) with Laemmli sample buffer and heated at 90 °C for 2 min. They were then allowed to cool at room temperature before loading onto 10% SDS-polyacrylamide gels (1 h at 120 mV) and were subsequently transferred (2.5 h at 200 mA at 4 °C) onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Trans-Blot Transfer Medium, Ref.: 162-0115). Each experimental group consisted of N=6 animals. A sample of each group was run concurrently and a colorimetric molecular mass marker including standards ranging from 6 to 196 kDa (Bio-Rad, Ref.: 161-0318) was loaded onto the last lane of the gel to determine protein size. Following transfer, blots were reversibly stained with Ponceau Solution (Sigma Chemical Co.) to verify complete transfer of the proteins to the membrane. Immunostaining of the membrane was performed by saturating non-specific sites with PBS with 0.1% Tween-20 (PBST) with 5% non-fat dry milk for 2 h at room temperature and then incubating the membranes with the primary antibody, rabbit polyclonal anti-cannabinoid CB₁ receptor (Thermo Scientific, Ref.: PA1-745), diluted 1:250 in PBST with 5% non-fat dry milk overnight at 4 °C under constant stirring.

The membranes were then washed with PBST (three times, 10 min each time) and incubated for 2 h at room temperature under stirring with the secondary antibody, donkey anti-rabbit HRP conjugated, diluted 1:600 (Thermo Scientific, Ref.: SA1-200) in PBST with 5% non-fat dry milk. After three 5-min washes in PBST, immunoreactive protein bands were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Bio-Rad, Immuno-Star HRP Chemiluminescent Kits) according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescent images were visualized with AGFA Curix, RP2PLUS film. Several exposure times ranging from 5 s to 15 min were tested to determine the clearest visualization. The membranes were also probed, using the same method, with the monoclonal antibody anti- β -actin, diluted 1:750 (SIGMA, Ref.: A5441), and the secondary antibody goat anti-mouse IgG (Fab specific) peroxidase conjugate, diluted 1:2500 (SIGMA, Ref.: A3682), which was used as a loading control for normalization of CB₁ blots. The autoradiographic films were digitized using a scanner, and the relative optical density of the blots was determined with ImageJ software 1.43x (NIH, USA). Using the molecular mass marker as reference, the protein band we obtained was determined to correspond to a mass of approximately 23 kDa. This size is that of 23 kDa reported by the supplier and Twitchell et al. (1997). We employed an anti-CB₁ receptor antibody that recognizes residues 1–77 of the CB₁ receptor. When used in a Western blot procedure this antibody detects protein bands of ~23 kDa, ~60 kDa, ~72 kDa, and ~180 kDa in rat brain homogenate. Twitchell et al. (1997) demonstrated that these bands are related with the cannabinoid receptor (the larger, 70 kDa species might reflect differential glycosylation and the lower may represent proteolytic fragments). We detected one of these proteolytic fragments of the CB₁ receptor. Previous Western blot studies have demonstrated that the most abundant protein species for CB₁ are 52–60 kDa (consistent with the monomeric CB₁ species with various extensions of glycosylation), but several smaller and larger protein bands have also been reported (see for example Cichewicz et al., 2001; Egertova and Elphick, 2000; Grimsey et al., 2008; Shire et al., 1995). Western blot values were corrected using the internal membrane protein control of load β -actin. The relative optical density of the blots from the male control (Co) group was used as a reference (100%), and data for the other experimental groups were expressed as a percentage of Co males.

2.8. Leptin and corticosterone plasma measurements

Plasma leptin levels were measured with a rat ELISA kit from B-Bridge International (Cupertino, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The sensitivity of the test is 0.5 ng/ml. All samples were run in duplicate. Plasma corticosterone concentration was measured using a solid phase ¹²⁵I radioimmunoassay (Immunechem™ Corticosterone ¹²⁵I RIA kit for rats and mice, MP Biomedicals, Orangeburg, NY). The detection limit was 7.7 ng/ml and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were less than 10%.

2.9. Statistical analysis

CPP data were analysed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with two between-subjects factor – sex (male or female) and neonatal manipulation (Co or MD) – and a within-subjects factor, days (Pre-C and Post-C). Open field data, 5-HT and 5-HIAA, CB₁ expression, leptin and corticosterone were analysed by means of a two-way ANOVA, with sex (male or female) and neonatal manipulation (Co or MD) as factors. To satisfy the assumption of normality for the ANOVA, leptin level data were transformed. Post hoc comparisons (Bonferroni) were performed with a level of significance set at $p < 0.05$. Additional ANOVAs split by one of the independent factors were performed to further clarify the results observed. Statistical analyses were performed using the SPSS 19.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. CPP

The ANOVA of the data obtained after MDMA conditioning revealed that the interaction sex \times neonatal manipulation \times days was significant [$F(1,41) = 4.86$; $p < 0.05$]. Post hoc comparison showed that non-deprived males spent more time in Post-C than in Pre-C in the drug-paired compartment, which implied acquisition of CPP. In Post-C, MD males spent less time in the drug-paired compartment than non-deprived males ($p < 0.05$) (see Fig. 2).

3.2. Open field

The analysis of the parameters measured in this test revealed a significant effect of sex, with males spending more time in the periphery than females [$F(1,39) = 21.23$; $p < 0.001$] and females showing the highest values for time spent in the centre of the apparatus [$F(1,39) = 9.79$; $p < 0.01$] and time of rearing [$F(1,39) = 20.25$;

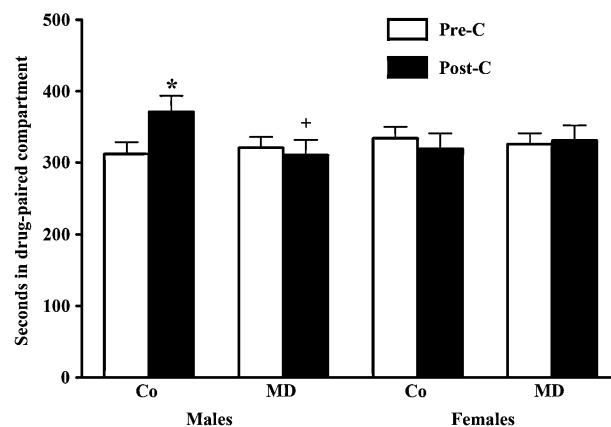


Fig. 2. Acquisition of place conditioning induced by MDMA. Adolescent male and female rats were conditioned with 2.5 mg/kg of MDMA. Histograms represent time (mean \pm SEM) spent in the drug-paired compartment before (white) and after (black) the conditioning session. Co: control ($N = 10$ males and 11 females); MD: maternal deprived ($N = 12$ males and 12 females). Post hoc comparisons, * $p < 0.05$, significant difference with respect to pre-conditioning values. + $p < 0.05$, significant difference with respect to Co Males.

$p < 0.001$]. No significant differences were found regarding latency to enter the centre of the apparatus (see Fig. 3). No significant effects were produced by the MD protocol.

3.3. Monoamines assay

The data obtained from the analysis of biogenic amines are summarized in Table 1. The ANOVA performed for levels of 5-HT in the striatum revealed a significant sex \times neonatal manipulation interaction [$F(1,39) = 5.00$; $p < 0.05$]; MD males showed lower levels of 5-HT than both MD females and non-deprived males. With respect to 5-HIAA in the striatum, there was also a significant interaction of sex \times neonatal manipulation [$F(1,39) = 80.336$; $p < 0.01$]. Post hoc comparisons revealed higher 5-HIAA levels in MD females than in non-deprived females, whereas non-deprived males showed higher 5-HIAA levels than non-deprived females and MD males. The ANOVA performed for 5-HT levels in the cortex revealed significant effects of neonatal manipulation [$F(1,39) = 6.02$; $p < 0.05$] and the interaction sex \times neonatal manipulation [$F(1,39) = 7.41$; $p < 0.01$]. Post hoc comparisons indicated significantly lower levels of 5-HT in MD males than in non-deprived animals of the same sex. With respect to 5-HIAA content in the cortex, a significant effect was observed for sex [$F(1,39) = 4.91$; $p < 0.05$] and neonatal manipulation [$F(1,39) = 5.81$; $p < 0.05$]. Post hoc comparisons revealed higher levels of 5-HIAA in males than in females and lower levels 5-HIAA in MD rats than in non-deprived animals. The analysis of hippocampal 5-HT and 5-HIAA levels did not reveal significant differences.

3.4. CB₁ receptor assay

The two-way ANOVA showed that the interaction sex \times neonatal manipulation had significant effects [$F(1,24) = 5.28$, $p < 0.05$]. An additional one-way ANOVA for males revealed a marginally significant effect of MD in this sex [$F(1,12) = 4.50$, $p = 0.055$]. Indeed, as shown in Fig. 4, MD increased the expression of CB₁ receptor protein in the hippocampus of males treated with MDMA, an effect that was not observed in females.

3.5. Leptin and corticosterone plasma measurements

The two-way ANOVA for corticosterone data revealed a significant effect of sex [$F(1,35) = 22.57$; $p < 0.001$]. As Fig. 5 shows, both control and MD females exhibited higher hormone levels than their

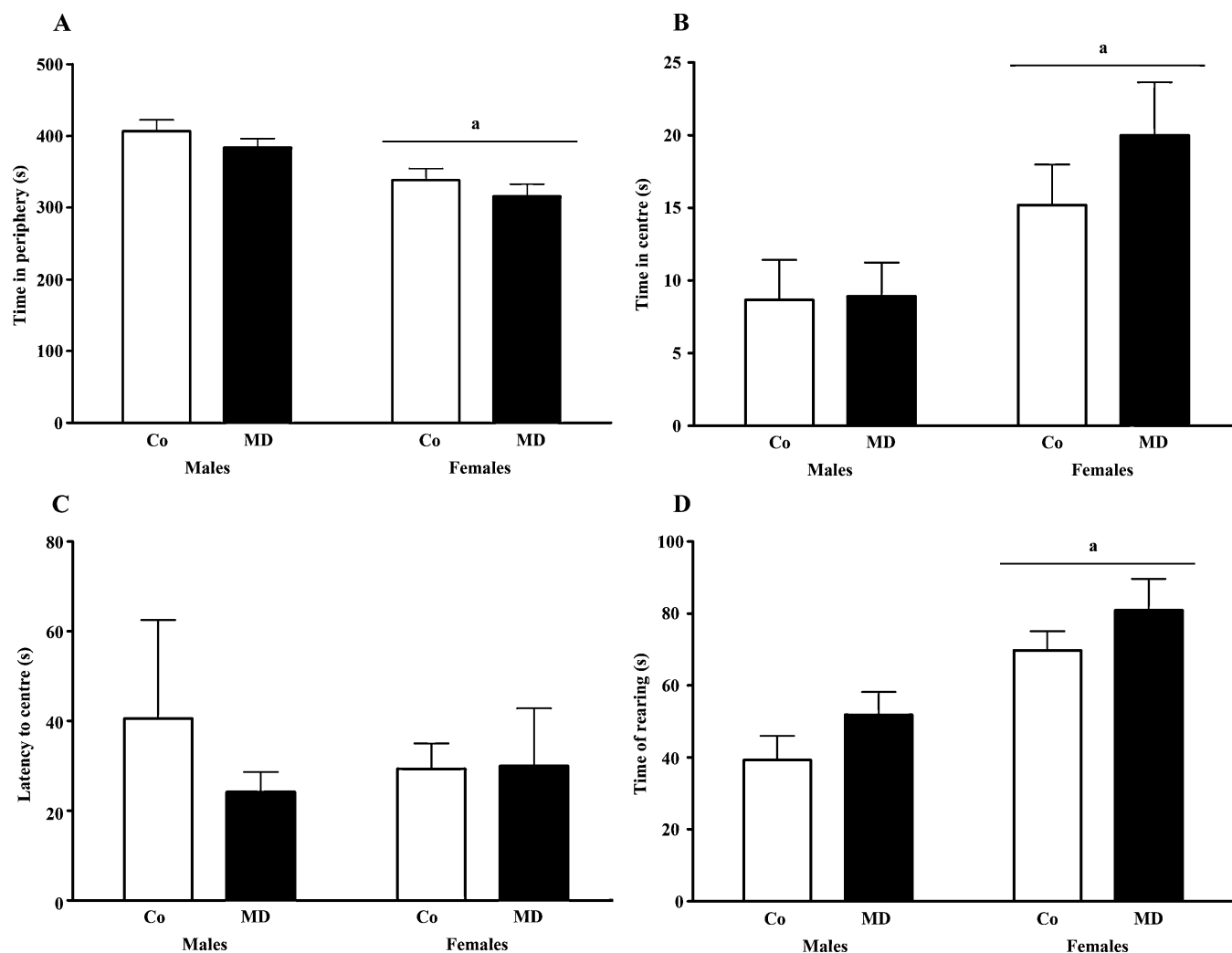


Fig. 3. Exploration in the open field test. Young adult rats (PND 60) were exposed to a novel environment for 8 min. Histograms represent the time (mean ± SEM) spent walking in the periphery (A) or in the centre (B), latency to enter the centre of the apparatus (C) and the time of rearing (D). Co: control ($N = 10$ males and 11 females); MD: maternally deprived ($N = 12$ males and 12 females). ANOVA ($p < 0.05$), (a) significant overall effect of sex.

male counterparts ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ for control and maternally deprived animals, respectively). The MD protocol did not induce any significant effect.

A significant effect of sex was also found when leptin plasmatic levels were analysed [$F(1,28) = 13.70$; $p < 0.001$], with females displaying lower leptin levels than males. As Fig. 6 shows, MD males tended to have higher leptin levels than control males, though the difference did not reach statistical significance. Thus, the MD protocol did not induce any significant effect.

4. Discussion

This study provides the first evidence that a single 24 h episode of MD on PND 9 induces sex-dependent long-term alterations in the behavioural and neurochemical effects of adolescent exposure to MDMA. The conditioned rewarding effects of MDMA were weaker, serotonin levels in the striatum and cortex were lower, the expression of CB1R in the hippocampus was more marked, and levels of circulating leptin tended to be higher in adolescent

Table 1
Effects of maternal deprivation on the serotonergic system in discrete brain regions of MDMA-treated animals.

	Males		Females	
	Non-deprived	Maternally deprived	Non-deprived	Maternally deprived
Striatum				
5-HT	425 ± 25	354 ± 38 [*]	394 ± 30	445 ± 31 [#]
5-HIAA	264 ± 17	224 ± 16 [*]	214 ± 10 [*]	260 ± 14 [§]
Cortex				
5-HT	444 ± 32	347 ± 19 [*]	407 ± 10	385 ± 21
5-HIAA	134 ± 10	106 ± 9 ^b	108 ± 7 [*]	93 ± 8 ^b
Hippocampus				
5-HT	177 ± 13	180 ± 12	182 ± 15	174 ± 17
5-HIAA	171 ± 13	196 ± 9	176 ± 7	162 ± 15

5-HT: serotonin; 5-HIAA: 5-hydroxyindole acetic acid. Levels expressed in ng/mg of tissue. ANOVA ($p < 0.05$), ^b significant overall effect of maternal deprivation. Post hoc analyses, ^{*} $p < 0.05$ vs non-deprived males; [#] $p < 0.05$ vs maternally deprived males; [§] $p < 0.05$ vs non-deprived females.

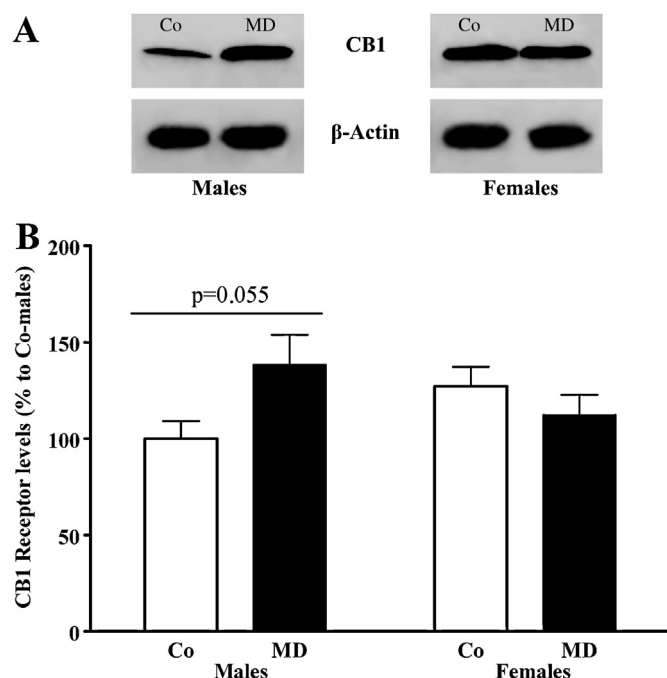


Fig. 4. CB₁ receptor expression within the hippocampus. (A) Representative Western blot immunoassay of CB₁ receptor protein from whole tissue homogenates in the different experimental groups. All animals were administered with MDMA (2.5 mg/kg). Bands correspond with the 23 kDa CB₁ receptor protein. Blots were reprobated with anti- β actin to ensure accurate protein load. All wells were loaded with 20 μ g of protein. (B) Quantification of CB₁ receptor. Histograms (mean \pm SEM) represent the percentage of the relative change in the blots' optical density with respect to the male control group. Co: control; MD: maternal deprivation. $N = 6$ per experimental group.

male MD rats than in male non-deprived rats. No differences were observed between MD and non-deprived females with respect to these parameters. No significant effects of MD on corticosterone levels or emotional behaviour were observed. Sex-differences were observed in the CPP paradigm during adolescence irrespective of whether or not there had been neonatal manipulation (female rats did not show MDMA-induced CPP). Moreover, in accordance with previous studies, females exhibited less anxiety-related behaviours in the open field and lower leptin (Llorente et al., 2011; Viveros et al., 2010b) and higher corticosterone levels (Llorente et al., 2007) than males during adulthood.

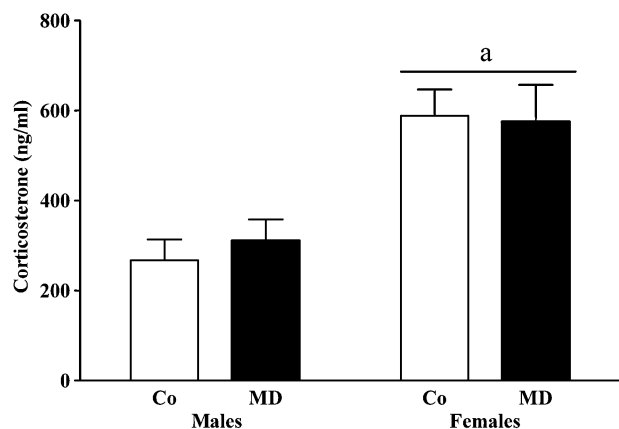


Fig. 5. Corticosterone levels. Histograms represent the mean \pm SEM of plasma corticosterone levels (ng/ml). All animals were administered with MDMA (2.5 mg/kg). Co: control; MD: maternal deprived. ANOVA ($p < 0.05$), (a) significant overall effect of sex.

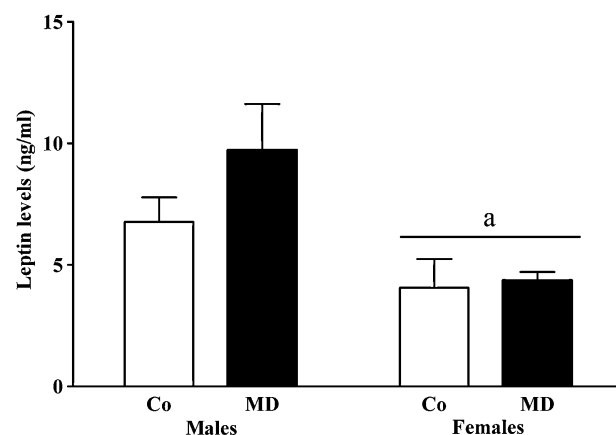


Fig. 6. Leptin levels. Histograms represent mean \pm SEM of plasma leptin levels (ng/ml). All animals were administered with MDMA (2.5 mg/kg). Co: control; MD: maternal deprived. ANOVA ($p < 0.05$), (a) significant overall effect of sex.

There is evidence that in adult rodents MD reduces sensitivity to the reinforcing effects of stimulants, and generally more so in males (Campbell and Spear, 1999; Matthews et al., 1999; Moffett et al., 2006). Our results support this idea, since the conditioned rewarding effects of MDMA were less pronounced among adolescent male MD rats. Although adolescence is a period of enhanced sensitivity to drugs of abuse (Schramm-Sapota et al., 2009), the long-term effects of maternal separation/deprivation on vulnerability to drugs of abuse in adolescent rodents have been addressed by only two studies. Adolescent male rats separated for 3 h daily on PND 2–14 did not show changes in the susceptibility to methamphetamine CPP (Faure et al., 2009). Conversely, adolescent male mice experiencing a single episode of MD (24-h long between PND 12 and PND 13) exhibited impaired motivation for cocaine self-administration (Martini and Valverde, 2012). In particular, the time required for achieving the acquisition of self-administration was significantly longer and the breaking point values in a progressive schedule were significantly lower among MD adolescent mice. Moreover, MD animals also displayed anxiety- and depressive-like behaviours and lower brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the amygdala and hippocampus, brain structures related to emotional and cognitive processes. On the basis of their results, the authors of that study argued that MD may lead to the development of anhedonia, which in turn could be related with impaired motivation for cocaine consumption (Martini and Valverde, 2012). Our results add to this line of evidence, demonstrating for the first time that MD impairs the rewarding effects of MDMA in adolescent male rats. Interestingly, we have previously reported that adolescent rats submitted to our MD protocol exhibit lower levels of hippocampal BDNF (Marco et al., 2012) and depressive-like behaviour in the forced swim test (Llorente et al., 2007). In the present study, we have not observed long term effects of MD on emotional-like behaviours in MDMA-treated rats in the open field, which is in line with the lack of effect on circulating corticosterone levels.

Interestingly, MD males, in which the rewarding effect of MDMA was less marked, had lower striatal and cortical 5-HT levels than non-deprived males in adulthood. As in the CPP, these effects were sex-dependent, as no changes were observed in females. These results are in accordance with those of previous studies in our laboratory that revealed diverse sexual dimorphisms in the effects of MD, with males proving to be more vulnerable to this neonatal stressful event (Llorente et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2012; Viveros et al., 2009). Brain serotonin systems have been associated with the rewarding effects of MDMA, and serotonin antagonists block MDMA-induced CPP (Bilsky and Reid,

1991). Moreover, MDMA acts primarily by releasing 5-HT from pre-synaptic 5-HT terminals (Schmidt et al., 1987), which eventually leads to a persistent loss of brain serotonergic neuron functioning and a reduction in 5-HT and 5-HIAA levels (Battaglia et al., 1987; Sarkar and Schmued, 2010). Previous studies have shown that different protocols of maternal separation can induce alterations in brain serotonergic systems, such as decreased 5-HT levels in the ventral striatum (Kosten et al., 2004), increased hippocampal 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and cortical 5-HT₂ receptors and lower levels of 5-HT_{1A} receptors in the raphe nuclei (Vázquez et al., 2002), and higher SERT levels in the amygdala (Vicentic et al., 2006). It is likely that the reduction of cortical and striatal 5-HT levels observed in MD males in the present study was functionally related to the altered MDMA-induced CPP in these animals.

In the present study, we choose to assess CB1 receptor expression in the hippocampus, since it has been demonstrated that chronic treatment with MDMA increases CB1 receptor expression in this brain structure (Nawata et al., 2010) and that hippocampal CB1 receptors play a role in the acquisition of CPP (Zarrindast et al., 2007). Moreover, we have previously shown that MD induces a decrease in CB1R expression in the hippocampus (López-Gallardo et al., 2012; Suárez et al., 2009). Here, we observed that expression of the hippocampal CB1 cannabinoid receptor is more pronounced in MD-males when compared to non-deprived males. The higher levels of hippocampal CB1R in MD males can be a consequence of functional interactions between MD and MDMA in this sex. It would seem that MD induces long-term changes in the endocannabinoid system of males, which are reflected in an altered response of this system to adolescent MDMA administration. It can be hypothesized that the down-regulation of CB1R and cannabinoid system induced by MD induces compensatory changes that make male rats more sensitive to the effects of MDMA administration on hippocampal CB1R expression. Since the cannabinoid system plays a role in the rewarding effects of MDMA (Bairda et al., 2005; Daza-Losada et al., 2011; Manzanedo et al., 2010), it can be speculated that the increase of CB1R in MD males is related with the lack of MDMA-induced CPP in these animals. However, the molecular mechanisms underlying these effects cannot be fully explained at this moment. One possibility is that the overexpression of CB1R undermines the rewarding effects of MDMA; previous results obtained by our group showed that stimulation of CB1R with a high dose of the CB1 agonist WIN 55212-2 reduced MDMA-induced CPP in mice (Manzanedo et al., 2010). Moreover, mice treated with MDMA plus WIN 55212-2 displayed lower levels of cortical 5-HT, an effect that could also be related with the lack of rewarding effects of MDMA. Interestingly, we have observed a decrease in cortical 5-HT in MD male rats in the present study. We cannot rule out that the increase in hippocampal CB1R affected learning and memory in the animals. It is possible that MD rats conditioned with MDMA have learning deficits that interfere with the acquisition of CPP. A recent study demonstrated that withdrawal from MDMA induces an impairment of recognition memory in rats, which may result from the activation of CB1R in the hippocampus (Nawata et al., 2010). Recent studies indicate the existence of an interaction between endocannabinoid and serotonin systems, with endocannabinoids suppressing excitatory synaptic transmission to dorsal raphe serotonin neurons through the activation of presynaptic CB1 receptors (for a review, see Haj-Dahmane and Shen, 2011). Thus, the decrease in serotonin levels in male deprived rats could have been related with the increase in the expression of CB1 receptors observed in these animals.

We also evaluated leptin levels, since it has been demonstrated that leptin receptors are expressed in extrahypothalamic sites that are important in modulating reward and addiction, including DA neurons of the ventral tegmental area projecting to the nucleus accumbens (Fulton et al., 2006). We have observed a strong trend

towards elevated circulating leptin levels in MDMA-treated MD males when compared to non-deprived males. This effect cannot be exclusively attributed to our MD protocol, since we have previously seen how it induces a long-lasting reduction of circulating leptin levels (Viveros et al., 2010a, 2010b, 2009). Body weight is reduced during adolescence (Llorente et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2011) but not during adulthood (Viveros et al., 2010b). On the other hand, Kobeissy et al. (2008) reported that acute MDMA administration induced a short-term decrease of circulating leptin levels. However, the long-term consequences of MDMA treatment on this hormone have not been studied. Our results suggest that the combination of both MD and MDMA treatment cause functional interactions which are responsible for the slight increase in leptin levels in MD males. Moreover, since leptin appears to reduce the motivation to acquire rewards (Davis et al., 2011), it can be speculated that its increase in MD males receiving MDMA is related to the lack of CPP in these animals.

Sex-differences were also observed among non-maternally deprived rats in the rewarding properties of MDMA, open field behaviour and hormone levels under the present conditions. Firstly, the dose of MDMA we used induced CPP in males but not in females. A number of reports have shown that MDMA induces CPP in male mice (Daza-Losada et al., 2011, 2007; Manzanedo et al., 2010) and rats (Bilsky and Reid, 1991; Bairda et al., 2005; Catlow et al., 2010; Cole and Sumnall, 2003; Schechter, 1991). However, we are not aware of any study to have tested the rewarding effects of MDMA in female rats in the CPP paradigm. Previous data obtained with other psychostimulants such as cocaine or amphetamine suggest that females are more sensitive to these drugs than males (Segarra et al., 2010; Silverman and Koenig, 2007). Conversely, in the present study we observed that MDMA did not induce CPP in adolescent female rats at a dose that was effective in their male counterparts. It is important to note that we used a low dose of MDMA with the objective of determining whether or not MD would induce changes in the rewarding effects of this drug. If we had used a larger dose, female rats would probably have developed CPP, but we do not believe that we would have observed differences between rats with and without MD (both showing CPP). In line with our results, pubescent males have been shown to be more sensitive than females to the locomotor and hyperpyretic effects of MDMA, which contrasts with previous reports of dimorphisms in the effects of other psychostimulants (Koenig et al., 2005). According to one explanation given by Koenig et al. (2005), the higher sensitivity of adolescent males could be due to a transient overproduction of D1 and D2 receptors. Andersen et al. (1997) reported that between PND 25 and PND 40, the production of striatal D1 and D2 receptors increased by 65% and 144%, respectively, in males (vs 35% and 31% in females). Sex differences in the pharmacokinetics of MDMA (Fonsart et al., 2009) could also contribute to the fact that our females did not show MDMA-induced CPP. Sex differences have also been reported in the human response to MDMA, with female users showing more negative effects than males (Liechti et al., 2001; Verheyden et al., 2002). Our results suggest that males experience more positive effects after MDMA consumption than their female counterparts, which may explain the higher levels of consumption among adolescent and young males. Secondly, in the open field, males spent more time in the periphery and showed less rearing (vertical activity, exploration) than females. Rats display thigmotaxis – they tend to ambulate close to the walls of the apparatus since they have an aversion to open spaces – and increased thigmotaxis is thought to be indicative of enhanced emotionality (Gray, 1987; Valle and Bols, 1976). The present findings are in accordance with most of the literature regarding sex differences in the open field, which indicate that female rats are more active and show less “emotionality” than males (Gray, 1987; Kokras et al., 2012). It is improbable that the effects observed were due

to a residual effect of MDMA, since this drug had been administered 20 days before the open field test was performed. Moreover, in contrast to the greater thigmotaxis observed in males in our study, acute MDMA increased thigmotaxis in females (Pálénicek et al., 2005). Thirdly, females showed higher levels of corticosterone than males, a sex-difference which is also repeatedly reported in the literature (Llorente et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2011; Mitsushima et al., 2003; Viveros et al., 2010a, 2010b). Fourthly, our males exhibited higher plasma leptin levels than their female counterparts, which once again confirm previous data supporting the same type of sex differences regarding this hormone in rats (Llorente et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2011; Viveros et al., 2010a, 2010b). Sex differences in leptin levels are likely to reflect the actions and interactions of sex steroids (oestrogen and testosterone), but how such effects are mediated is still unclear (Smith and Waddell, 2003; Viveros et al., 2010b). Leptin and corticosterone changes were sex-dependent but were not affected by maternal deprivation. Females showed less rewarding effects after MDMA and less emotionality in the open field and presented lower leptin and higher corticosterone levels than males. It is possible that lower leptin levels in females contributed to their lack of response to MDMA in the CPP paradigm, since it has been reported that mice without leptin receptors show a diminished locomotor response to amphetamine and do not develop locomotor sensitization after repeated amphetamine administration (Fulton et al., 2006). Conversely, the higher corticosterone levels in females do not seem to be related with a reduction in the rewarding effects of MDMA, since corticosterone administration can facilitate the acquisition of amphetamine self-administration (Piazza et al., 1991). Similarly, changes in leptin or corticosterone levels observed in females do not seem to contribute to their lower emotionality in comparison to males in the open field.

In conclusion, the present data demonstrated for the first time that MD induces sex-dependent behavioural and neurochemical alterations in MDMA-treated adolescent rats, with males showing themselves to be more sensitive to MD than females. MD alters the MDMA CPP in adolescent males, which may be at least partially related with an alteration in the way their serotonergic and cannabinoid systems function. These sexual dimorphisms, as well as those described in non-MD animals, could be related to the organizational and activational effects of gonadal steroids (Viveros et al., 2011, 2009), though pharmacokinetic factors cannot be ruled out. The results of the present study suggest that a single 24 h episode of MD on PND 9 have a long-term sex-dependent impact on the neurobiological substrates of brain reward. The evidence of decreased MDMA CPP in adolescent male rats with a history of MD support the hypothesis that exposure to early life stress induces long-term changes in vulnerability to addiction in humans. Impairment of the reward system during adolescence can have significant consequences in terms of drug use and the subsequent development of addiction, since subjects experiencing reduced levels of reward in baseline conditions or after drug consumption may increase their consumption in order to achieve noticeable rewarding effects (Bruijnzeel et al., 2004; Leventhal et al., 2010). Moreover, greater drug consumption during adolescence has been repeatedly associated with enhanced vulnerability to the development of drug addiction (Chambers et al., 2003; Crews et al., 2007). Gender and early life challenges are both factors that can modify the extent to which MDMA induces rewarding effects and provokes dependence, and should both be considered when treating individuals who develop MDMA-related disorders.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

Ministerio de Ciencia e Innovación. Dirección General de Investigación (PSI2011-24762/PSIC), Instituto de Salud “Carlos III” (FIS), RETICS, Red de Trastornos Adictivos (RD06/001/0016 y RD06/0001/1013) GRUPOS UCM-BSCH: Ref. UCM 951579 and Generalitat Valenciana, Conselleria de Educación (PROM-ETEO/2009/072). ALB has a FPU predoctoral grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. These funding sources had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

We wish to thank Brian Normanly for his revision of the manuscript's English.

References

- Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., 2009. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res. Rev.* 59, 253–277.
- Andersen, S.L., Rutstein, M., Benzo, J.M., Hostetter, J.C., Teicher, M.H., 1997. Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. *Neuroreport* 8, 1495–1498.
- Battaglia, G., Yeh, S.Y., O'Hearn, E., Molliver, M.E., Kuhar, M.J., De Souza, E.B., 1987. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 911–916.
- Battaglia, G., Yeh, S.Y., De Souza, E.B., 1988. MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29, 269–274.
- Bava, S., Tapert, S.F., 2010. Adolescent brain development and the risk for alcohol and other drug problems. *Neuropsychol. Rev.* 20, 398–413.
- Beydoun, H., Saftlas, A.F., 2008. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 22, 438–466.
- Bilsky, E.J., Reid, L.D., 1991. MDL72222, a serotonin 5-HT₃ receptor antagonist, blocks MDMA's ability to establish a conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39, 509–512.
- Braida, D., Iosue, S., Pegorini, S., Sala, M., 2005. 3,4-Methylenedioxymetamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) is mediated by endocannabinoid system. *Pharmacol. Res.* 51, 177–182.
- Bruijnzeel, A.W., Repetto, M., Gold, M.S., 2004. Neurobiological mechanisms in addictive and psychiatric disorders. *Psychiatr. Clin. North Am.* 27, 661–674.
- Campbell, J., Spear, L.P., 1999. Effects of early handling on amphetamine-induced locomotor activation and conditioned place preference in the adult rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 143, 183–189.
- Catlow, B.J., Badanich, K.A., Sponaugle, A.E., Rowe, A.R., Song, S., Rafalovich, I., Sava, V., Kirstein, C.L., Sanchez-Ramos, J., 2010. Effects of MDMA (“ecstasy”) during adolescence on place conditioning and hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 628, 96–103.
- Chambers, R.A., Taylor, J.R., Potenza, M.N., 2003. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am. J. Psychiatry* 160, 1041–1052.
- Cichewicz, D.L., Haller, V.L., Welch, S.P., 2001. Changes in opioid and cannabinoid receptor protein following short-term combination treatment with delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 121–127.
- Cole, J.C., Sumnall, H.R., 2003. The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymetamphetamine (MDMA). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 199–217.
- Crews, F., He, J., Hodge, C., 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 189–199.
- Davis, J.F., Choi, D.L., Schurdak, J.D., Fitzgerald, M.F., Clegg, D.J., Lipton, J.W., Figlewicz, D.P., Benoit, S.C., 2011. Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biol. Psychiatry* 69, 668–674.
- Daza-Losada, M., Ribeiro Do Couto, B., Manzanedo, C., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., 2007. Rewarding effects and reinstatement of MDMA induced CPP in adolescent mice. *Neuropsychopharmacology* 32, 1750–1759.
- Daza-Losada, M., Miñarro, J., Aguilar, M.A., Valverde, O., Rodríguez-Arias, M., 2011. Acute blockade of CB1 receptor leads to reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 33–39.
- Egertova, M., Elphick, M.R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB₁. *J. Comp. Neurol.* 422, 159–171.
- EMCDDA, 2011. Annual Report 2011: The State of the Drug Problem in Europe. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- Faure, J., Stein, D.J., Daniels, W., 2009. Maternal separation fails to render animals more susceptible to methamphetamine-induced conditioned place preference. *Metab. Brain Dis.* 24, 541–559.
- Ferraz-de-Paula, V., Stankevicius, D., Ribeiro, A., Pinheiro, M.L., Rodrigues-Costa, E.C., Florio, J.C., Lapachinske, S.F., Moreau, R.L., Palermo-Neto, J., 2011.

- Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 428–437.
- Fonsart, J., Menet, M.C., Debray, M., Hirt, D., Noble, F., Scherrmann, J.M., Declèves, X., 2009. Sprague-Dawley rats display sex-linked differences in the pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 339–347.
- Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E.N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 2006. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51, 811–822.
- Graham, D.L., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2010. Glucose and corticosterone changes in developing and adult rats following exposure to (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine or 5-methoxydiisopropyltryptamine. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 152–157.
- Gray, J.A., 1987. *The Psychology of Fear and Stress. Problems in the Behavioural Sciences*, vol. 5, second ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Grimsey, N.L., Goodfellow, C.E., Scotter, E.L., Dowie, M.J., Glass, M., Graham, E.S., 2008. Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *J. Neurosci. Methods* 171, 78–86.
- Haj-Dahmane, S., Shen, R.Y., 2011. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* 61, 414–420.
- Heffner, T.G., Hartman, J.A., Seiden, L.S., 1980. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 453–456.
- Kobeissy, F.H., Jeung, J.A., Warren, M.W., Geier, J.E., Gold, M.S., 2008. Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addict. Biol.* 13, 15–25.
- Koenig, J., Lazarus, C., Jeltsch, H., Ben Hamida, S., Riegert, C., Kelche, C., Jones, B.C., Cassel, J.C., 2005. MDMA (ecstasy) effects in pubescent rats: males are more sensitive than females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 635–644.
- Kokras, N., Dalla, C., Sideris, A.C., Dendi, A., Mikail, H.G., Antoniou, K., Papadopoulos-Daifoti, Z., 2012. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. *Neuropharmacology* 62, 436–445.
- Kosten, T.A., Zhang, X.Y., Kehoe, P., 2004. Infant rats with chronic neonatal isolation experience show decreased extracellular serotonin levels in ventral striatum at baseline and in response to cocaine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 152, 19–24.
- Leventhal, A.M., Brightman, M., Ameringer, K.J., Greenberg, J., Mickens, L., Ray, L.A., Sun, P., Sussman, S., 2010. Anhedonia associated with stimulant use and dependence in a population-based sample of American adults. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 18, 562–569.
- Liechti, M.E., Gamma, A., Vollenweider, F.X., 2001. Gender differences in the subjective effects of MDMA. *Psychopharmacology (Berl.)* 154, 161–168.
- Llorente, R., Arranz, L., Marco, E.M., Moreno, E., Puerto, M., Guaza, C., De la Fuente, M., Viveros, M.P., 2007. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 636–650.
- Llorente, R., O'Shea, E., Gutierrez-Lopez, M.D., Llorente-Berzal, A., Colado, M.I., Viveros, M.P., 2010. Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. *Neurosci. Lett.* 479, 112–117.
- Llorente, R., Miguel-Blanco, C., Aisa, B., Lachize, S., Borcel, E., Meijer, O., Ramirez, M.J., De Kloet, E.R., Viveros, M.P., 2011. Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J. Neuroendocrinol.* 23, 329–344.
- Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., López-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, M.P., Nadal, R., 2011. Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict. Biol.* 16, 624–637.
- Llorente-Berzal, A., Mela, V., Borcel, E., Valero, M., López-Gallardo, M., Viveros, M.P., Marco, E.M., 2012. Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. *Neuropharmacology* 62, 1332–1341.
- López-Gallardo, M., López-Rodríguez, A.B., Llorente-Berzal, A., Rotllant, D., Mackie, K., Armario, A., Nadal, R., Viveros, M.P., 2012. Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience* 204, 90–103.
- Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Daza-Losada, M., Maldonado, C., Aguilar, M.A., Miñarro, J., 2010. Effect of the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice. *Behav. Brain Funct.* 6, 19.
- Marco, E.M., Adriani, W., Llorente, R., Laviola, G., Viveros, M.P., 2009. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 498–507.
- Marco, E.M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M.J., Viveros, M.P., 2012. Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.014>.
- Martini, M., Valverde, O., 2012. A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 219, 149–158.
- Matthews, K., Robbins, T.W., Everitt, B.J., Caine, S.B., 1999. Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine self-administration in adult rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 141, 123–134.
- Mitsushima, D., Masuda, J., Kimura, F., 2003. Sex differences in the stress induced release of acetylcholine in the hippocampus and corticosterone from the adrenal cortex in rats. *Neuroendocrinology* 78, 234–240.
- Moffett, M.C., Harley, J., Francis, D., Sanghani, S.P., Davis, W.I., Kuhar, M.J., 2006. Maternal separation and handling affects cocaine self-administration in both the treated pups as adults and the dams. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 1210–1218.
- Nawata, Y., Hiranita, T., Yamamoto, T., 2010. A cannabinoid CB(1) receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology* 35, 515–520.
- Páleníček, T., Votava, M., Bubeníková, V., Horáček, J., 2005. Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol. Behav.* 86, 546–553.
- Piazza, P.V., Maccari, S., Deminière, J.M., Le Moal, M., Mormède, P., Simon, H., 1991. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2088–2092.
- Sarkar, S., Schmued, L., 2010. Neurotoxicity of ecstasy (MDMA): an overview. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 460–469.
- Schechter, M.D., 1991. Effect of MDMA neurotoxicity upon its conditioned place preference and discrimination. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 344–359.
- Schmidt, C.J., Levin, J.A., Lovenberg, W., 1987. In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 36 (5), 747–755.
- Schramm-Sapota, N.L., Walker, Q.D., Caster, J.M., Levin, E.D., Kuhn, C.M., 2009. Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animal models. *Psychopharmacology (Berl.)* 206, 1–21.
- Segarra, A.C., Agosto-Rivera, J.L., Febo, M., Lugo-Escobar, N., Menéndez-Delmestre, R., Puig-Ramos, A., Torres-Díaz, Y.M., 2010. Estradiol: a key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. *Horm. Behav.* 58, 33–43.
- Shalev, U., Erb, S., Shaham, Y., 2010. Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Res.* 1314, 15–28.
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P., 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 270, 3726–3731.
- Silverman, J.L., Koenig, J.L., 2007. Evidence of the involvement of ErbA and RGS9-2 in 17-beta estradiol enhancement of amphetamine-induced place preference behavior. *Horm. Behav.* 52, 146–155.
- Smith, J.T., Waddell, B.J., 2003. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J. Endocrinol.* 176, 313–319.
- Suárez, J., Llorente, R., Romero-Zerbo, S.Y., Mateos, B., Bermúdez-Silva, F.J., de Fonseca, F.R., Viveros, M.P., 2009. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19, 623–632.
- Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K., 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 78, 43–50.
- Tzschentke, T.M., 1998. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* 56, 613–672.
- Valle, F.P., Bols, R.J., 1976. Age factors in sex differences in open-field activity of rats. *Learn. Behav.* 4, 457–460.
- Vázquez, D.M., Eskandari, R., Zimmer, C.A., Levine, S., López, J.F., 2002. Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocrinology* 27, 245–272.
- Verheyden, S.L., Hadfield, J., Calin, T., Curran, H.V., 2002. Sub-acute effects of MDMA (+/- 3,4-methylenedioxymethamphetamine, ecstasy) on mood: evidence of gender differences. *Psychopharmacology (Berl.)* 161, 23–31.
- Vicentic, A., Francis, D., Moffett, M., Lakatos, A., Rogge, G., Hubert, G.W., Harley, J., Kuhar, M.J., 2006. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience* 140, 355–365.
- Vidal-Infer, A., Roger-Sanchez, C., Daza-Losada, M., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., Aguilar, M.A., 2012. Role of the dopaminergic system in the acquisition, expression and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in adolescent mice. *PLoS ONE* 7 (8), e43107.
- Viveros, M.P., Llorente, R., López-Gallardo, M., Suarez, J., Bermúdez-Silva, F., De la Fuente, M., Rodríguez de Fonseca, F., García-Segura, L.M., 2009. Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, S217–S226.
- Viveros, M.P., Díaz, F., Mateos, B., Rodríguez, N., Chowen, J.A., 2010a. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm. Behav.* 57, 405–414.
- Viveros, M.P., Llorente, R., Díaz, F., Romero-Zerbo, S.Y., Bermúdez-Silva, F.J., Rodríguez de Fonseca, F., Argente, J., Chowen, J.A., 2010b. Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Horm. Behav.* 58, 808–819.
- Viveros, M.P., Marco, E.M., López-Gallardo, M., García-Segura, L.M., Wagner, E.J., 2011. Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1740–1751.
- Walker, Q.D., Williams, C.N., Jotwani, R.P., Waller, S.T., Francis, R., Kuhn, C.M., 2007. Sex differences in the neurochemical and functional effects of MDMA in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 189, 435–445.
- Wallinga, A.E., Grahmann, C., Granneman, R.A., Koolhaas, J.M., Buwalda, B., 2011. Gender differences in hyperthermia and regional 5-HT and 5-HIAA depletion in the brain following MDMA administration in rats. *Brain Res.* 1398, 13–20.
- Zarrindast, M.R., Nouri, M., Ahmadi, S., 2007. Cannabinoid CB1 receptors of the dorsal hippocampus are important for induction of conditioned place preference (CPP) but do not change morphine CPP. *Brain Res.* 1163, 130–137.

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

Este estudio proporciona la primera evidencia de que un solo episodio de SM de 24 horas a DP 9 produce alteraciones sexo-dependientes en los efectos conductuales y neuroquímicos de la exposición adolescente a MDMA.

Sólo los machos controles mostraron CPP tras la administración de MDMA, mientras que la droga no indujo CPP ni en los machos sometidos a SM ni en ningún grupo de hembras. Los presentes resultados demuestran por primera vez que la SM causa una alteración en los efectos gratificantes de la MDMA en ratas macho adolescentes. En la etapa adulta, los machos SM, mostraron unos niveles menores de serotonina que los machos no-SM en el estriado y la corteza. Como en el CPP, estos efectos fueron sexo-dependientes, puesto que no se observaron cambios en las hembras. Es posible que la reducción de los niveles de serotonina en la corteza y el estriado observada en los machos SM del presente estudio esté funcionalmente relacionada con la respuesta alterada del CPP inducida por MDMA en estos animales. La expresión de los receptores cannabinoides CB1 en el hipocampo fue mayor en los machos SM que en los machos no-SM. En el capítulo anterior vimos cómo nuestro protocolo de SM producía una disminución significativa de la expresión de receptores CB1 hipocampales en animales adultos. Los mayores niveles de receptores CB1 hipocampales hallados en el presente estudio podrían por tanto deberse a interacciones funcionales entre la SM y la MDMA en este sexo. La sobreexpresión de receptores CB1 en los machos SM podría relacionarse con el debilitamiento de los efectos gratificantes de la MDMA. Sin embargo, no podemos excluir que el incremento de los receptores CB1 hipocampales haya podido afectar al aprendizaje y a la memoria de los animales y que haya interferido con la adquisición de la CPP.

Hemos observado una fuerte tendencia hacia un aumento de los niveles circulantes de leptina en animales macho SM con respecto a los machos no-SM (recordemos que todos los animales de este estudio fueron expuestos a la MDMA). Nuestros resultados sugieren que la combinación de ambos, la SM y un tratamiento con MDMA causa interacciones funcionales que son responsables de este pequeño aumento

de los niveles de leptina ya que como vimos en el capítulo anterior, la SM, *per se* produce una disminución a largo plazo de los niveles circulantes de esta hormona aún observables durante la etapa adulta.

Refiriéndonos ahora a los dimorfismos sexuales observados en los animales no-SM, se encontraron diferencias sexuales en el paradigma de la CPP durante la adolescencia (las ratas hembra no mostraron CPP inducida por MDMA a la dosis estudiada, mientras que sí lo hicieron los machos). Además, las hembras mostraron menos conductas relacionadas con ansiedad en el campo abierto (los machos pasaron más tiempo en la periferia e hicieron menos *rearing* (actividad vertical, exploración)). A nivel endocrino, las hembras tuvieron menores niveles de leptina y mayores concentraciones de corticosterona que los correspondientes machos. Estos últimos datos referidos a diferencias sexuales en emotividad/ansiedad, así como en relación a niveles circulantes de las hormonas estudiadas, coinciden plenamente con anteriores estudios de otros autores y de nuestro propio grupo en animales no sometidos a ningún tratamiento (que serán citados en la discusión general), lo que demuestra que la exposición a MDMA de los animales de este estudio durante la adolescencia no fue capaz de anular estas diferencias debidas al sexo.

En conclusión, los presentes datos demuestran por primera vez que nuestro modelo de SM es capaz de modular los efectos conductuales y neuroquímicos inducidos por la exposición a MDMA en ratas adolescentes, siendo los machos más sensibles a la SM que las hembras. La SM altera el CPP producido por la MDMA en machos adolescentes, lo que podría, al menos parcialmente, relacionarse con las alteraciones en el funcionamiento de los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide en estos animales.

Efectos a largo plazo de la administración de cocaína durante el período periadolescente sobre receptores cannabinoides CB1 y CB2 en un modelo animal de separación materna temprana en ratas de ambos sexos.

En los últimos años ha habido un aumento de la literatura que demuestra la relación entre la exposición a un agente estresante en periodos tempranos de la vida y la aparición de los síntomas clínicos de enfermedades psiquiátricas (Heim y Nemeroff, 2001; Afifi *et al.*, 2008), incluyendo la adicción a drogas (Enoch, 2011), y respuestas inmunes desequilibradas (Bellinger *et al.*, 2008). De manera similar, en modelos de roedores, se han descrito secuelas conductuales, neuroendocrinas e inmunológicas perjudiciales como consecuencia a largo plazo de un estrés en un periodo temprano de la vida. De hecho, se ha visto que la separación materna (SM) temprana en ratas, un único episodio de separación de la madre durante 24 h a día postnatal (DP) 9, provoca una desregulación de la reactividad al estrés y de la función inmune (De la Fuente *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2009; Llorente *et al.*, 2007) junto con alteraciones conductuales que se asemejan a una sintomatología de tipo depresivo y psicótico (Marco *et al.*, 2009; Ellenbroek *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que el estrés, y también la SM, afecta significativamente a las respuestas conductuales a diferentes drogas de abuso, incluyendo la cocaína (Miczek *et al.*, 2008; Sinha, 2008).

La cocaína es una droga estimulante con importantes propiedades adictivas (Nnadi *et al.*, 2005; Büttner *et al.*, 2003). Se ha visto que la cocaína produce un aumento de la actividad locomotora (Carey *et al.*, 2005), y los cocainómanos normalmente sufren de importantes alteraciones inmunológicas (Fox *et al.*, 2012; Cabral, 2006). Actualmente, el abuso de cocaína es particularmente elevado entre jóvenes adultos, cuya proporción de consumo fue en 2010 del 1,5% (SAMHSA, 2011). A pesar del aumento de la tasa de consumo de cocaína entre los jóvenes, los estudios con animales apenas han investigado las consecuencias a largo plazo de la exposición a cocaína durante la adolescencia.

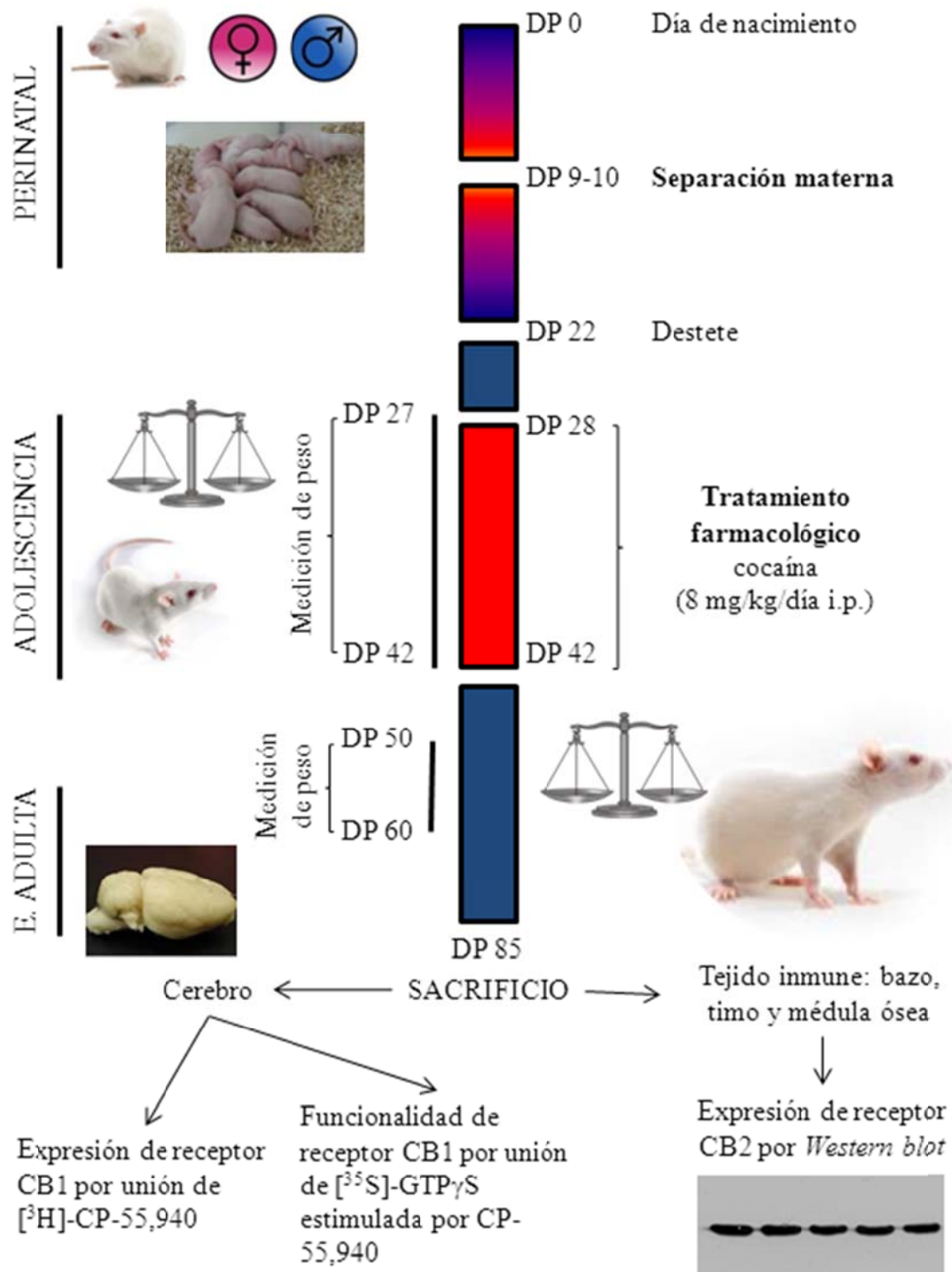
El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de señalización lipídico y retrógrado que actúa principalmente a través de la activación de receptores cannabinoides acoplados a proteínas G, con distintas propiedades farmacológicas y patrones de distribución, i.e. los receptores cannabinoides CB1 y CB2. El receptor CB1 es predominante en el sistema nervioso central, con una presencia abundante en regiones cerebrales involucradas en el procesamiento emocional, la motivación, la activación motora y la función cognitiva (Mackie, 2005). En cambio, el receptor CB2 ha sido clásicamente ubicado en tejido inmune periférico (Pacher y Mechoulam, 2011; Atwood y Mackie, 2010).

Se ha visto que la exposición a un estrés durante periodos tempranos del desarrollo puede alterar el normal desarrollo del SEC. En particular, la SM causó un incremento significativo del contenido de 2-araquidonilglicerol (2-AG), uno de los principales ligandos del SEC (Llorente *et al.*, 2008), posiblemente mediante la alteración de la expresión de las enzimas responsables de su metabolismo (Suárez *et al.*, 2010). De manera similar, se ha sugerido que el SEC podría estar involucrado en alguno de los efectos neuroconductuales de la cocaína (Parolaro y Rubino, 2008). El bloqueo genético y farmacológico de los receptores CB1 produjo una disminución de la motivación de los animales por la autoadministración de cocaína (Xi *et al.*, 2008; Soria *et al.*, 2005) y también se ha visto que los receptores CB1 actúan sobre la sensibilización locomotora inducida por esta droga (Corbille *et al.*, 2007). Además, se ha implicado a los receptores CB1 en el fenómeno de recaída a la cocaína (Xi *et al.*, 2006; De Vries *et al.*, 2001). Es más, la exposición crónica a cocaína durante la edad adulta causó una disminución de los niveles de ARNm del receptor CB1 en ciertas regiones cerebrales, i.e. el núcleo ventromedial del hipotálamo y la corteza cerebral (González *et al.*, 2002b) al igual que una modesta reducción de los niveles de 2-AG en el sistema límbico del prosencéfalo (González *et al.*, 2002a).

En vista de lo anteriormente expuesto, resulta de gran interés analizar las consecuencias a largo plazo de un estrés en etapas tempranas de la vida sobre el SEC y las posibles interacciones con la exposición adolescente a cocaína. Por tanto, en el presente estudio quisimos investigar los efectos a largo plazo de la SM temprana en combinación con la exposición adolescente a cocaína sobre la expresión y la

funcionalidad del receptor CB1 en el cerebro al igual que sobre la expresión del receptor CB2 en el tejido inmune. Dado que se han descrito importantes diferencias sexuales relacionadas con el estrés durante periodos tempranos del desarrollo (Viveros *et al.*, 2009) al igual que en relación al patrón de consumo de cocaína (SAMHSA, 2011) y sus efectos (Anker *et al.*, 2011), analizamos en este estudio el efecto del factor sexo en todos los experimentos.

DISEÑO EXPERIMENTAL





Perspective

Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure[☆]

Alvaro Llorente-Berzal^{a,*}, María A. Assis^b, Tiziana Rubino^c, Erica Zamberletti^c,
Eva M. Marco^{a,*}, Daniela Parolaro^c, Emilio Ambrosio^b, María-Paz Viveros^{a,*}

^a Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^b Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid, Spain

^c DBSF and Neuroscience Center, University of Insubria, Busto Arsizio, VA, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2012

Received in revised form 6 May 2013

Accepted 7 May 2013

Keywords:

Maternal deprivation

Cocaine

Adolescence

Sex differences

Cannabinoid receptors

ABSTRACT

Early life stress has been associated with several psychiatric disorders, including drug addiction. Actually, maternal deprivation (MD) alters the endocannabinoid system, which participates in motivation and reward for drugs, including cocaine. At youth, the rate of cocaine abuse is alarmingly increasing. Herein, we have investigated the consequences of MD and/or adolescent cocaine exposure in brain CB1Rs and CB2Rs in immune tissues. Control and maternally deprived (24 h on postnatal day, pnd, 9) male and female Wistar rats were administered cocaine (8 mg/kg/day) or saline during adolescence (pnd 28–42). At adulthood, [³H]-CP-55,940 autoradiographic binding was employed for the analysis of CB1R density and CP-55,940-stimulated [³⁵S]-GTPgammaS binding for CB1R functionality; CB2R expression was analyzed by Western blotting. Sex differences in CB1R expression and functionality were found, and MD induced important and enduring sex-dependent changes. In addition, the plastic changes induced by adolescent cocaine administration in brain CB1Rs were differentially influenced by early life events. MD increased spleen CB2R expression while adolescent cocaine administration attenuated this effect; cocaine exposure also diminished CB2R expression in bone marrow. Present findings provide evidence for changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of early life stress and adolescent cocaine exposure, and indicate functional interactions between both treatments, which in many regions differ between males and females.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Early life stress has been extensively associated with adverse physical and emotional outcomes that occur later in life. Increasing literature provides evidence for a link between the exposure to early life stressors and the appearance of clinical symptoms of psychiatric disorders [1,2], including drug addiction [3], and maladaptive immune responses [4]. Similarly, in rodent models, detrimental behavioral, neuroendocrine and immunological sequels have been described as long-lasting consequences of early-life stress.

Actually, early maternal deprivation (MD) in rats, a single 24 h episode of mother-litter separation on early postnatal days, has been reported to provoke a deregulation of stress reactivity and immune function together with behavioral alterations that resemble depressive- and psychotic-like symptoms [5–8]. In addition, stress, and also MD, has been demonstrated to significantly affect behavioral responses to different drugs of abuse, including cocaine [9,10]. Cocaine is a potent stimulant drug with highly addictive properties [11,12] that also provokes important immunological alterations among abusers [13,14]. At present, cocaine abuse is particularly high among young adults, whose rate of cocaine consumption was 1.5% in 2010 [15]. Despite the increasing rate of cocaine consumption in the juvenile population, animal studies have scarcely investigated the long-term consequences of cocaine administration during adolescence.

The endocannabinoid (eCB) system is a retrograde lipid signaling system which mainly acts through the activation of G-protein-coupled cannabinoid receptors, with different pharmacological properties and distribution patterns, i.e., cannabinoid

[☆] Perspective articles contain the personal views of the authors who, as experts, reflect on the direction of future research in their field.

* Corresponding authors at: Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, C/ José Antonio Novais n° 2, 28040 Madrid, Spain.
Tel.: +34 913944993/4939; fax: +34 913944935.

E-mail addresses: pazviver@bio.ucm.es, emmarco@bio.ucm.es (M.-P. Viveros).

receptor type 1, CB1R and type 2, CB2R. CB1R is predominant within the central nervous system, with an abundant presence in brain regions involved in emotional processing, motivation, motor activation and cognitive function [16]. In contrast, CB2R has been classically located in peripheral immune tissues mediating immunosuppression [17]. Exposure to early life stress influence eCB system development. In particular, MD significantly increased the content of 2-arachidonyl glycerol (2-AG), one of the main endogenous ligands [18], possibly by altering the expression of the enzymes responsible for its metabolism [19]. Similarly, the eCB system seems to underlie some of the neurobehavioral effects of cocaine [20]. Genetic and pharmacological blockade of CB1Rs decreased animals' motivation for cocaine self-administration [21,22], CB1Rs appear to mediate cocaine-induced locomotor sensitization [23], as well as cocaine relapse [24,25]. Moreover, chronic cocaine exposure during adulthood induced a decrease in CB1R mRNA levels in certain brain regions, i.e., ventromedial hypothalamic nucleus and cerebral cortex [26] as well as a modest reduction of 2-AG content within the limbic forebrain [27]. Great interest and concern on the investigation of the long-lasting affection of the eCB system due to early life stress and adolescent cocaine exposure has arisen. Therefore, we investigated the long-term effects of early MD in combination with adolescent cocaine exposure on brain CB1R expression and functionality as well as CB2R expression in immune tissues. Since remarkable sex differences have been described regarding the consequences of early life stress [28,29] and also in relation to cocaine consumption patterns [15] and effects [30], male and female animals were considered in the present study.

2. Materials and methods

Experiments were approved by the local Animal Ethics Committee, and were designated and performed in compliance with the Royal Decree 1201/2005, October 21, 2005 (BOE n° 252) about protection of experimental animals, and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

2.1. Animals

Wistar albino rats of both sexes were used. Subjects were the offspring of rats purchased from Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain) mated (one male \times two females) approximately 2 weeks after their arrival. All animals were maintained at constant conditions of temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 2\%$) in a reverse 12 h dark/light cycle (lights on at 08.00 p.m.), with free access to food (A04/A03; Safe, Augy, France) and water. On the day of birth (pnd 0), litters were culled and sex balanced to eight pups per dam (four males and four females). At weaning (pnd 22), animals were housed in groups of four siblings of the same sex per cage.

2.2. Maternal deprivation

Maternal deprivation (MD) was performed as previously described [31]. In brief, dams from the MD group were removed from their home cages at pnd 9 (09.00 a.m.) leaving rat pups by their own for 24 h. On pnd 10 (09.00 a.m.), dams were placed back in their corresponding home-cage. Dams from the control group were briefly removed from their home-cages on pnd 9 and 10 to mimic the manipulation submitted to the experimental group.

2.3. Pharmacological treatment

Cocaine hydrochloride (Alcaliber, Madrid, Spain) was dissolved in saline (0.9%) at a final concentration of 4 mg/ml. Given the

critical period selected for drug administration (adolescence), and the schedule of drug administration (15 consecutive days), a moderate dose of cocaine, previously reported in literature [32], was selected. In brief, rats received daily intraperitoneal injections of cocaine (Coc, 8 mg/kg), or saline (Sal), at a volume of 2 ml/kg, during adolescence (from pnd 28 to 42).

2.4. Experimental design

Rats were assigned to eight experimental groups (8–16 animals per group) according to (i) sex (males or females), (ii) neonatal manipulation (control or MD) and (iii) adolescent cocaine administration (Sal or Coc). Animals' body weight was registered at both pnd 9 and 10 to control for maternal deprivation effects. Thereafter, body weight was registered daily from pnd 27 to 42 to investigate cocaine effects during treatment; and from pnd 50 to 60 to study cocaine withdrawal effects on body weight gain. Body weight before pharmacological treatment (drug-free state, on pnd 27) was used as the reference value to calculate the percentage of body weight gain for each animal. Once finished the experimental procedures – except for body weight control – animals were left undisturbed and sacrificed by decapitation on pnd 85. Brains were rapidly removed, as well as immune tissues (spleen, thymus and bone marrow), samples were flash frozen in dry ice and stored at -80°C .

2.5. Autoradiographic-binding studies

Brain coronal sections (20 μm thick) were cut on a cryostat and thaw-mounted on gelatin-coated slides. Sections were then stored at -80°C until they were processed for autoradiographic-binding studies.

2.5.1. [^3H]CP-55,940 receptor autoradiographic-binding

Slides were brought to room temperature, then incubated for 2.5 h at 37°C with 10 nM [^3H]CP-55,940 (Perkin Elmer Life Sciences, Milan, Italy) in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5% BSA). Adjacent cerebral sections were incubated in parallel with 10 μM CP-55,940 to assess non-specific binding. Sections were washed for 1 h at 4°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% BSA buffer and again for 3 h in the same conditions. They were then dipped in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 5 min) to remove excess BSA, dipped 5 min in distilled water and dried under a cool air stream. Autoradiograms were generated by exposing the dried sections for 14 days to Kodak Biomax MR films (Perkin Elmer Life Sciences, Milan, Italy).

2.5.2. CP-55,940-stimulated [^{35}S]GTP γS binding in autoradiography

Slides were incubated in assay buffer (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl_2 , 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 10 mU/adenosine deaminase, 0.1% BSA, pH 7.4) at 25°C for 10 min and then in 3 mM GDP in assay buffer at 25°C for 15 min. They were then transferred to assay buffer containing 3 mM GDP and 0.04 nM [^{35}S]GTP γS with (stimulated) or without (basal) 5 μM CP-55,940 and incubated at 25°C for 2 h. Slides were rinsed twice in 50 mM cold Tris-HCl buffer (pH 7.4) and once in deionised water, dried, and exposed to Kodak Biomax MR films (Perkin Elmer Life Sciences, Milan, Italy) for 48 h.

2.5.3. Image analysis

Autoradiographic film intensity was assessed by measuring gray levels with an image analysis system consisting of a scanner connected to a PC running Microsoft Windows. Images were analyzed using Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Each cerebral area was traced with the mouse cursor control using the Paxinos and Watson [33] atlas as reference and the light transmittance was determined as the gray level. Gray level of densitometric measurements calculated after subtraction of the

film background density was established within the linear range, determined using tritium standards (^3H Microscales, Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italy) for receptor-binding studies and ^{35}S standards made in the laboratory for [^{35}S]GTPgammaS binding studies. For GTPgammaS autoradiography, agonist-stimulated activity was calculated by subtracting the gray level in basal sections (GDP only) from that of agonist-stimulated sections and results were expressed as percentage of stimulation over basal activity.

2.6. CB2R immunoblotting

Membrane extracts of spleen, thymus and bone marrow were prepared as previously described [34]. Briefly, immune tissues were homogenized in HEPES 50 mM (pH 8)-sucrose 0.32 M buffer with protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany), and phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Roche, Mannheim, Germany). Homogenates were centrifuged at $800 \times g$ (10 min at 4°C) and supernatant centrifuged at $40,000 \times g$ (30 min at 4°C) to obtain the membrane fraction. Pellets were re-suspended in HEPES 50 mM (pH 8) buffer and homogenized.

For immunoblotting, equivalent amounts of membrane proteins (30 μg) from immune tissues homogenates were separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P PVDF membrane; Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Blots were pre-incubated with a blocking buffer containing TBS, 0.1% Tween 20, and 5% non-fat powdered milk (pH 7.8) at room temperature for 1 h, incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies and then, after two washes, incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Biotinylated marker proteins with defined molecular weights were used for molecular weight determination in Western blots (Precision Plus protein Western C Standards, Bio Rad, Hercules, CA, USA). The corresponding markers lane was incubated with Strep-Tactin peroxidase conjugated (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The specific protein bands were visualized by using the enhanced chemiluminescence kit ECL-Plus (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Films (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) were exposed to the membranes and developed for visualization of the immunoreactivity bands. Multiple exposures of each membrane were taken to ensure the linearity of the immunoreactive bands, which were quantified by using ImageJ-software. Western Blots showed that each primary antibody detected a protein of the expected molecular size. Herein, the antibodies used were: rabbit anti-rat CB2R (1:100) (Pierce Laboratories, Rockford, IL, USA), mouse anti-rat actin (1:10,000) (Sigma, St. Louis, MO, USA) goat anti-rabbit IgG (1:10,000) (Abcam, Cambridge, UK) and sheep anti-mouse IgG (1:10,000) (ECL, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Noteworthy, thymus analysis of CB2R expression by Western blotting did not render any legible band, possibly due to its low presence in this specific immune tissue [35,36], so data from thymus could not be quantified nor analyzed.

2.7. Statistical analysis

A three-way analysis of variance (ANOVA) was employed for the analysis of CB1R density and functionality data, with main factors being sex, neonatal manipulation and adolescent cocaine administration. Body weight data were analyzed with repeated measures ANOVA. Normality and homocedasticity were assessed with Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, respectively. When necessary, data were transformed to achieve normal distribution. Additional two-way ANOVAs split by one of the independent factors were performed to further clarify the observed results. Post hoc

comparisons using the Tukey test were performed with a level of significance set at $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out with the SPSS 19.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Though the initial number of animals per experimental group was of 8–16, due to technical and/or procedural reasons the number of data and/or samples analyzed may vary for the diverse parameters analyzed (see Table 2 and figure legends for additional information).

3. Results

3.1. Body weight gain

No differences in body weight were observed at the beginning of the experiments (pnd 9) [Co-males, 21.8 ± 0.3 g and MD-males, 22.0 ± 0.7 g; Co-females, 21.1 ± 0.3 g and MD-females, 21.0 ± 0.7 g]. However, as expected, the neonatal MD protocol significantly diminished body weight on the following day (pnd 10) [$F(1,74) = 28.98$, $p < 0.001$] while sex differences were in the limit of statistical significance [$F(1,74) = 3.5$, $p = 0.07$]. Control males and females gained weight from pnd 9 to 10 (control males increased in mean 1.7 ± 0.4 g and females 1.8 ± 0.4 g) whereas 24 h of MD provoked a significant weight loss in both male and female rats (MD male lost in mean 0.8 ± 0.1 g and females 1.0 ± 0.2 g).

During the drug treatment, and afterwards, body weight gain increased upon age [cocaine treatment, age: $F(1.3, 90.3) = 2720.7$, $p < 0.001$ and cocaine withdrawal, age: $F(2.4, 169.4) = 619.7$, $p < 0.001$] and a significant effect of sex were found [cocaine treatment, sex: $F(1,70) = 20.28$, $p < 0.001$ and cocaine withdrawal, sex: $F(1,70) = 83.26$, $p < 0.001$] with males growing at a higher rate than females. Following cocaine withdrawal, a significant effect of the neonatal condition [$F(1,70) = 8.73$, $p < 0.005$] as well as a significant interaction between the neonatal condition and the drug treatment, i.e., adolescent cocaine administration [$F(1,70) = 6.10$, $p < 0.05$]. Tukey Post hoc comparisons indicated that, among females, growth rate significantly differed between Co-Coc and MD-Coc animals at all the ages considered ($p < 0.05$), suggesting an opposite effect of adolescent cocaine administration on body weight gain depending upon the neonatal condition; earlier cocaine administration reduced body weight gain after drug withdrawal in control animals, while a subtle increase in body weight gain was observed among MD animals (see Fig. 1).

3.2. Brain CB1R density and functionality

Statistical results from the three-way ANOVA of CB1R density and functionality data from each brain region are reported in Table 1, and will be discussed in the already established order.

A general effect of sex was found for both CB1R density and functionality within the *ventral tegmental area* (VTA, see Table 2 and Fig. 2A, respectively). CB1R density and activity was higher among males when compared to females. Since significant interactions between factors were also found when analyzing CB1R functionality (see Table 1), a more in depth analysis was performed considering male and female animals separately. Among males, a significant effect of the adolescent drug treatment was revealed [drug effect, $F(1,20) = 4.55$, $p < 0.05$] together with a significant interaction between the neonatal condition and the drug treatment [$F(1,20) = 12.35$, $p < 0.01$]; post hoc comparisons revealed a significant difference in CB1R functionality between Co-Sal and Co-Coc in males ($p < 0.01$). In contrast, females' CB1R functionality seemed not to be modified by any of the treatments.

Within the *Nucleus Accumbens* (NAcc, Table 2 and Fig. 2B) only CB1R functionality was affected (see Table 1). CB1R functionality was higher among females compared to males. Given the significant interaction found between sex and neonatal condition

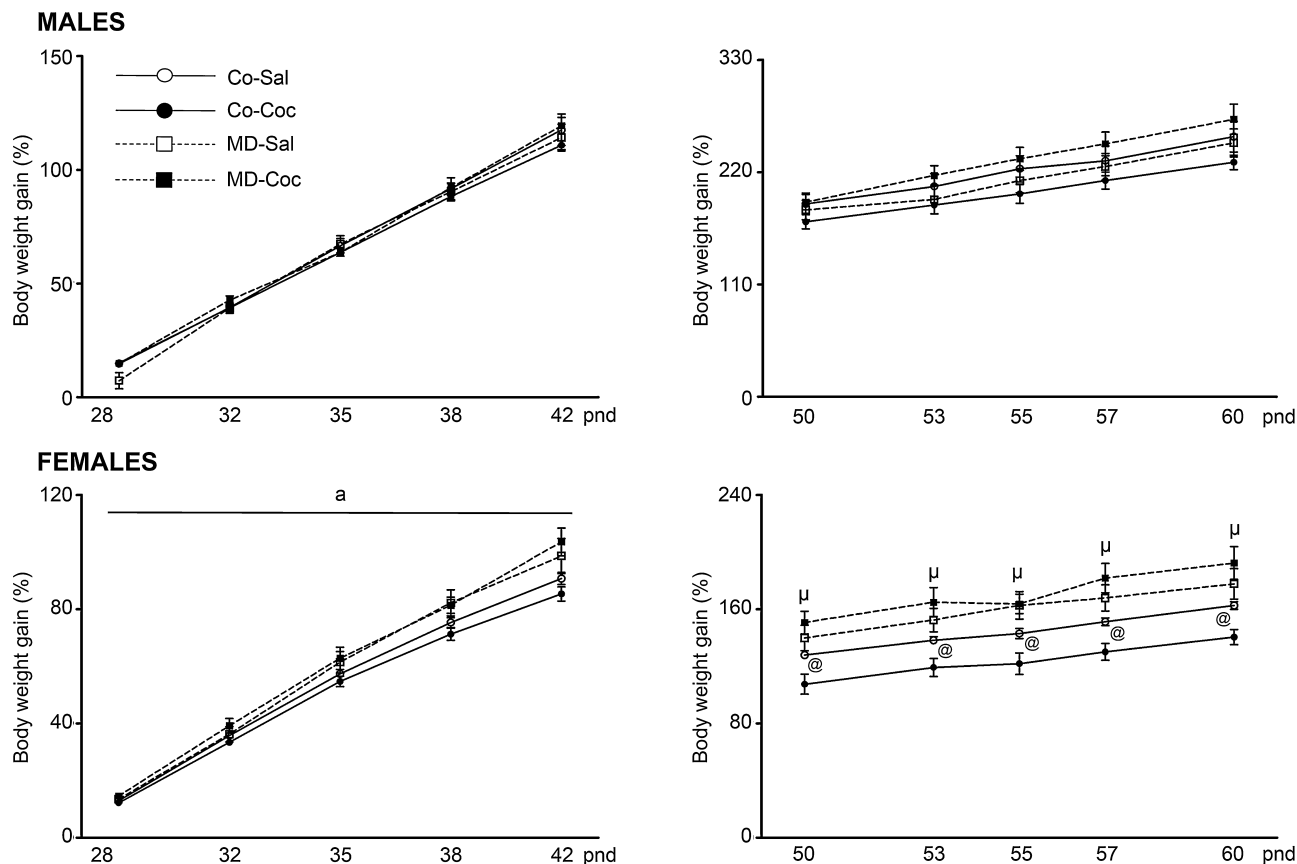


Fig. 1. Body weight gain of animals exposed to early life stress, maternal deprivation (MD, 24 h at pnd 9), or non-stressed (control, Co) and administered during adolescence (from pnd 28 to 42) with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day). Figures (mean \pm S.E.M.) represent the percentage of body weight gain referred to pnd 27 during the pharmacological treatment (left panels) and following drug withdrawal (right panels). $n = 7$ –15 per experimental group. Repeated measures three-way ANOVA ($P < 0.05$), (a) significant overall effect of sex. Tukey post hoc comparisons: $^{\circ}p < 0.05$ vs. Co-Sal males, $^{\mu}p < 0.05$ vs. Co-Coc of the same sex group. pnd, postnatal day.

(see Table 1), a further analysis revealed that the neonatal episode significantly affected NAcc CB1R functionality exclusively among male animals [$F(1,28) = 16.25$, $p < 0.001$], provoking a decrease in receptors' functionality.

For the *amygdala*, no changes in CB1R density were observed (Tables 1 and 2), but a significant effect of the sex condition appeared for CB1R functionality (Table 1). Amygdala CB1Rs were more active in females compared to males (Fig. 2C). Notably, a significant interaction between neonatal condition and drug treatment also appeared, indicating that cocaine administration only affected MD animals (not controls) by decreasing CB1R net stimulation (Fig. 2C).

Significant sex effects appeared for both CB1R density and functionality within the *hippocampus* (Table 1). In females, CB1R expression was slightly lower (Table 2) while CB1R activity appeared to be markedly increased when compared to male animals (Fig. 2D). Regarding CB1R density, a significant interaction between conditions was revealed, and post hoc comparisons indicated a significant difference between Co-Coc and MD-Coc ($p < 0.01$) among male animals, and the same trend although not significant was observed among females; adolescent cocaine administration in control animals tended to increase hippocampal CB1R expression, whereas in MD animals the opposite was observed. In contrast, exclusively among males, did adolescent cocaine administration increase hippocampal CB1R function [$F(1,28) = 10.00$, $p < 0.01$] both in Co and MD animals (Fig. 2D).

Sex differences in *prefrontal cortex* (PFC) were also found for both CB1R density and functionality (Table 1). Females presented lower expression levels but a higher activity rate when compared

to male counterparts (Table 2 and Fig. 2E). Adolescent cocaine administration decreased CB1R expression in the PFC of male control animals (see Table 2). Regarding CB1R functionality, the triple interaction was found to be significant (Table 1). In males, a significant effect of the neonatal condition was found [$F(1,28) = 7.30$, $p < 0.05$], with MD animals showing a reduced functionality of CB1Rs; whereas among females, a significant interaction between neonatal condition and drug was achieved [$F(1,27) = 5.22$, $p < 0.05$] although no significant differences were achieved by post hoc comparisons.

Sex differences were found for motor-related brain regions, namely *caudate putamen* (CPu), *substantia nigra* (SN) and *globus pallidus* (GP) (see Table 1). CB1R density values were lower for females compared to males whereas the opposite was found for CB1R stimulation data, at least for CPu and GP (Table 2 and Fig. 3). In CPu, cocaine appeared to slightly modify CB1R density exclusively among MD animals [$F(1,32) = 4.25$, $p < 0.05$] despite no statistical significance was achieved following post hoc comparisons (Table 2). As regards CB1R functionality, significant interactions were further analyzed and statistics indicate that, in male animals, CB1R function was significantly increased by cocaine administration but such an effect was no longer observed among MD males; within the females, none of the changes were significant (Fig. 3A). In SN, the investigation of the significant MD by drug interaction (Table 1) indicated that the neonatal manipulation significantly affected CB1R expression among saline-treated [$F(1,28) = 8.77$, $p < 0.01$] but not among cocaine-treated animals (Table 2). Concerning CB1R functionality, significant interactions between factors were found (Table 1) and post hoc comparisons revealed

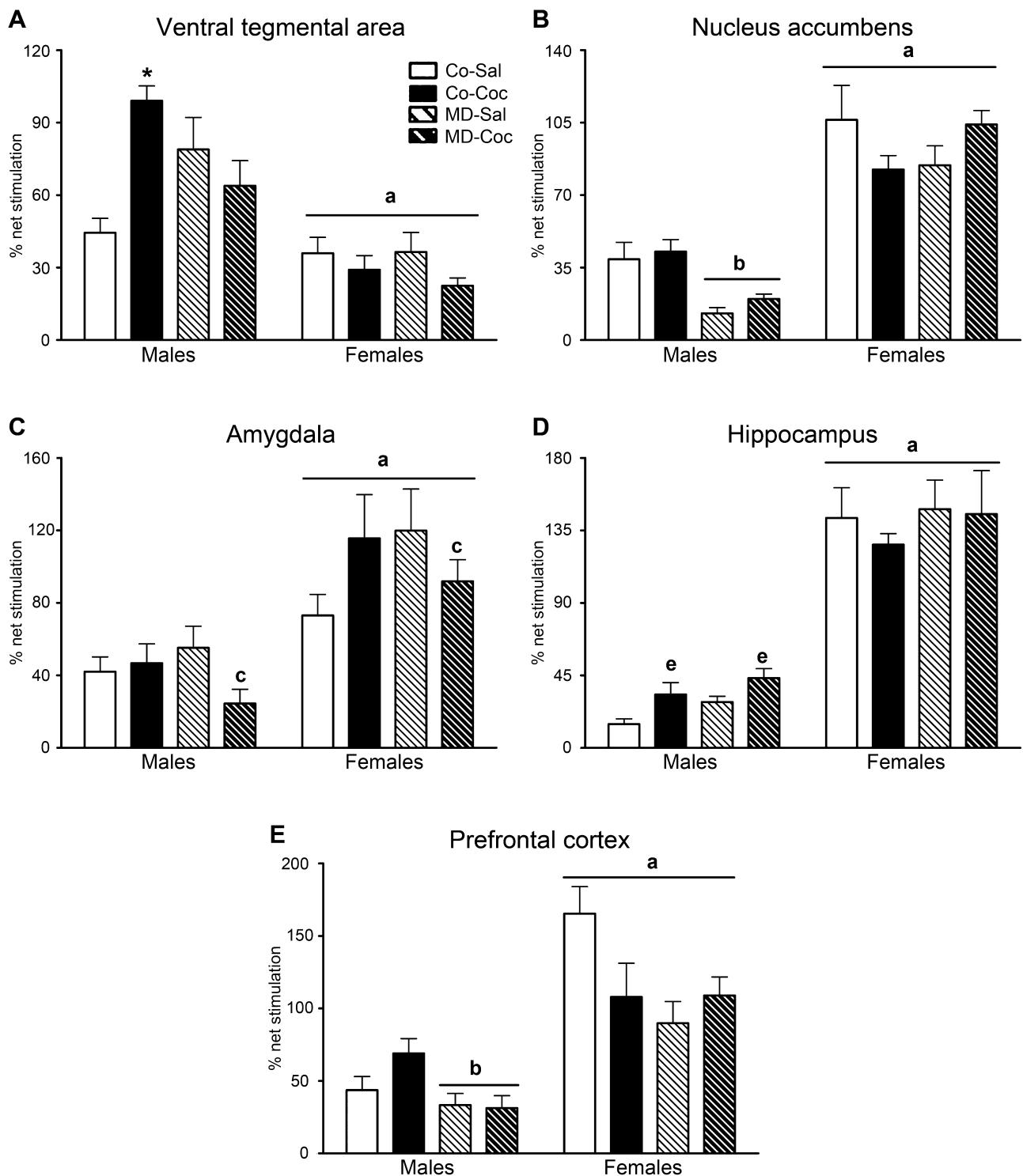


Fig. 2. CB1R functionality in ventral tegmental area (A), nucleus accumbens (B), amygdala (C), hippocampus (D) and prefrontal cortex (E) of adult animals exposed to early life stress, maternal deprivation (MD, 24 h at pnd 9), or non stressed (control, Co) and administered during adolescence (from pnd 28 to 42) with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day). Histograms (mean \pm S.E.M.) represent the percentage of net stimulation over basal activity. $n=6-8$ per experimental group. Three-way ANOVA ($P<0.05$), (a) significant overall effect of sex, (b) significant MD effect within the same sex group, (c) significant cocaine effect among MD animals, (e) significant cocaine effect within the same sex group. Tukey post hoc comparisons: * $p<0.05$ vs. Co-Sal of the same sex group.

that adolescent cocaine administration significantly decreased receptor functionality in males independently of the neonatal condition ($p<0.05$, Co-Sal vs. Co-Coc and MD-Coc), whereas among females adolescent cocaine administration induced a contrasting effect, i.e., an increase in CB1R functionality, only in MD animals ($p<0.05$, MD-Coc vs. Co-Sal, Co-MD and MD-Sal) (Fig. 3B). In GP,

cocaine administration significantly increased CB1R functionality within control animals [$F(1,28)=5.04$, $p<0.05$] but not in MD ones, no matter the sex of animals (Fig. 3C). No changes in GP CB1R expression were observed (Tables 1 and 2).

Thalamus CB1R density was significantly affected by neonatal manipulation in a sex-dependent manner (Table 1). MD decreased

Table 1
Main results from the three-way analysis of variance (ANOVA) of CB1R density and functionality data.

Brain areas	CB1R	Statistics	Sex	MD	Drug	Sex × MD	Sex × drug	MD × drug	Sex × MD × drug
VTA	Density	<i>F</i> (1,60)	4.35	–	–	–	–	–	–
		<i>p</i> -value	<0.05	–	–	–	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,40)	45.11	–	–	–	5.66	5.69	–
NAcc	Density	<i>F</i> (1,65)	–	–	–	–	–	–	–
		<i>p</i> -value	–	–	–	–	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,56)	165.23	4.53	–	8.98	–	–	–
Amyg	Density	<i>F</i> (1,62)	–	–	–	–	–	–	–
		<i>p</i> -value	–	–	–	–	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,56)	33.60	–	–	–	–	4.29	–
Hip	Density	<i>F</i> (1,60)	4.32	–	–	–	–	8.21	–
		<i>p</i> -value	<0.05	–	–	–	–	<0.01	–
	Function	<i>F</i> (1,56)	208.29	–	–	–	5.65	–	–
PFC	Density	<i>F</i> (1,70)	10.98	–	11.78	–	–	–	–
		<i>p</i> -value	<0.01	–	<0.01	–	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,55)	64.17	10.73	–	–	–	–	33.15
CPu	Density	<i>F</i> (1,64)	18.42	–	–	–	–	4.10	–
		<i>p</i> -value	<0.001	–	–	–	–	<0.05	–
	Function	<i>F</i> (1,56)	84.20	–	–	22.91	–	–	6.18
SN	Density	<i>F</i> (1,58)	6.36	–	5.96	–	–	6.68	–
		<i>p</i> -value	<0.05	–	<0.05	–	–	<0.05	–
	Function	<i>F</i> (1,42)	13.83	6.58	6.05	18.13	49.06	4.24	–
GP	Density	<i>F</i> (1,57)	15.75	–	–	–	–	–	–
		<i>p</i> -value	<0.001	–	–	–	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,55)	133.27	–	–	4.50	–	6.87	–
Thal	Density	<i>F</i> (1,56)	5.98	–	–	4.52	–	–	5.01
		<i>p</i> -value	<0.05	–	–	<0.05	–	–	<0.05
	Function	<i>F</i> (1,56)	70.36	–	20.60	31.44	–	–	12.12
Hypo	Density	<i>F</i> (1,62)	–	–	–	–	–	–	–
		<i>p</i> -value	–	–	–	–	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,56)	44.25	5.08	–	–	–	–	–
PAG	Density	<i>F</i> (1,63)	–	–	–	–	–	–	7.34
		<i>p</i> -value	–	–	–	–	–	–	<0.01
	Function	<i>F</i> (1,55)	–	–	–	5.61	13.35	19.32	19.32
Cb	Density	<i>F</i> (1,63)	7.62	–	–	4.75	–	–	–
		<i>p</i> -value	<0.01	–	–	<0.05	–	–	–
	Function	<i>F</i> (1,56)	–	36.92	–	–	11.74	–	7.68
		<i>p</i> -value	–	<0.001	–	–	<0.01	–	<0.01

CB1R expression and function were analyzed within specific brain regions in control and maternally deprived animals (MD, 24 h on postnatal day 9) administered with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day, i.p.) during adolescence, between postnatal days 28 and 42. Three-way ANOVA with factor being sex (males vs. females), neonatal manipulation (control vs. MD) and drug treatment (Sal vs. Coc). *F*, with degrees of freedom within parenthesis, and *p*-value. Non significant results are not included (–). Brain areas: VTA, ventral tegmental area; NAcc, nucleus accumbens; Amyg, amygdala; Hip, hippocampus; PFC, prefrontal cortex; CPu, caudate putamen; SN, substantia nigra; GP, globus pallidus; Thal, thalamus; Hypo, hypothalamus; PAG, periaqueductal gray; and Cb, cerebellum.

CB1R expression within males [$F(1,30)=5.71$, $p<0.01$] without modifying females' values (Table 2). Moreover, CB1R activity was higher in females compared to males, and thalamus CB1R functionality was modified in a sex-dependent manner. In males, only the combination of treatments was able to increase CB1R functionality. Among females, cocaine exposure significantly increased CB1R functionality, whereas neonatal MD was able to prevent such an effect (Fig. 4A).

Hypothalamic CB1R density was not affected by any of the factors considered (Table 2). However, CB1R functionality was significantly influenced by sex, and neonatal manipulation in a sex-dependent manner. Females exhibited higher levels of CB1R activity

compared to males, but only males' CB1R functionality was significantly diminished by MD (Fig. 4B).

In periaqueductal gray (PAG), a significant interaction between the three factors was found for the CB1R density data (Table 1), although post hoc comparisons were not able to reveal any significant difference between groups (Table 2). In relation to CB1R activity, no changes were observed among male animals; whereas, among females, MD induced a significant increase in PAG CB1R functionality that was normalized by adolescent cocaine administration (Fig. 4C).

Cerebellum CB1R expression was affected by the neonatal condition in a sex-dependent manner. MD augmented CB1R density

Table 2
CB1R density measured by [³H]CP-55,940 receptor autoradiographic-binding.

Brain areas	Males				Females			
	Co-Sal	Co-Coc	MD-Sal	MD-Coc	Co-Sal	Co-Coc	MD-Sal	MD-Coc
VTA ^a	99.8 ± 7.3	105.9 ± 8.2	96.7 ± 9.5	101.5 ± 8.8	97.2 ± 3.2	83.0 ± 5.6	84.1 ± 5.1	97.1 ± 6.9
NAcc	197.5 ± 9.6	185.1 ± 5.8	186.7 ± 7.3	177.0 ± 8.6	182.8 ± 6.0	190.0 ± 6.8	194.5 ± 9.3	202.1 ± 10.6
Amyg	158.5 ± 5.6	155.0 ± 7.7	156.5 ± 7.4	152.3 ± 7.4	161.8 ± 6.8	165.6 ± 11.5	173.5 ± 6.9	156.1 ± 10.9
Hip ^a	287.8 ± 12.0	303.1 ± 11.3	286.1 ± 9.5	256.4 ± 7.4 ^μ	280.6 ± 10.9	290.9 ± 4.5	292.6 ± 6.7	273.0 ± 8.8
PFC ^a	240.6 ± 4.4	216.8 ± 3.7 [*]	235.3 ± 6.4	226.2 ± 5.2	222.4 ± 5.4	215.0 ± 6.4	221.3 ± 3.9	212.5 ± 3.8
CPu ^a	279.0 ± 9.1	281.9 ± 11.3	277.0 ± 10.0	267.3 ± 7.5	249.8 ± 8.2	262.8 ± 4.9	257.7 ± 5.6	237.0 ± 5.3
SN ^a	474.5 ± 6.8	487.2 ± 14.0	534.0 ± 10.8 ^d	476.5 ± 12.6	470.7 ± 18.4	461.2 ± 10.8	491.2 ± 11.8 ^d	434.9 ± 26.9
GP ^a	420.6 ± 22.5	450.8 ± 10.2	433.9 ± 16.9	420.9 ± 18.2	370.5 ± 13.3	388.1 ± 13.6	385.5 ± 11.7	410.6 ± 16.3
Thal	165.3 ± 10.1	158.9 ± 5.2	136.1 ± 9.3 ^b	152.1 ± 5.2 ^b	156.1 ± 9.3	171.3 ± 5.0	170.5 ± 5.1	163.3 ± 6.0
Hypo	156.9 ± 7.3	145.4 ± 12.8	157.1 ± 13.6	132.1 ± 7.3	139.4 ± 6.9	151.0 ± 9.4	139.1 ± 5.4	139.8 ± 6.0
PAG	147.7 ± 7.2	156.7 ± 8.2	161.8 ± 8.4	131.1 ± 4.9	154.4 ± 4.1	137.5 ± 3.7	148.8 ± 5.9	148.3 ± 13.1
Cb	394.0 ± 9.4	404.2 ± 3.8	389.6 ± 7.3	402.5 ± 5.7	397.9 ± 4.2	404.9 ± 4.4	416.6 ± 4.0 ^b	414.8 ± 3.9 ^b

Mean ± SEM, expressed as mg/dl. Data come from control (Co) animals or animals exposed to a single episode of early maternal deprivation (MD, 24 h on pnd 9) that were administered with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day, i.p.) during adolescence (from pnd 28 to 42). Number of animals employed from each experimental group: males, Co-Sal (10), Co-Coc (11), MD-Sal (11), MD-Coc (10); females: Co-Sal (9), Co-Coc (9), MD-Sal (9), MD-Coc (9). Brain areas: VTA, ventral tegmental area; NAcc, nucleus accumbens; Amyg, amygdala; Hip, hippocampus; PFC, prefrontal cortex; CPU, caudate putamen; SN, substantia nigra; GP, globus pallidus; Thal, thalamus; Hypo, hypothalamus; PAG, periaqueductal gray; and Cb, cerebellum. Three-way ANOVA ($p < 0.05$), (a) significant overall effect of sex, (b) significant overall effect of MD within the same sex group, (d) significant MD effect among Sal-treated animals. Tukey post hoc comparisons: ^{*} $p < 0.05$ vs. Co-Sal of the same sex group; ^μ $p < 0.05$ vs. Co-Coc of the same sex group.

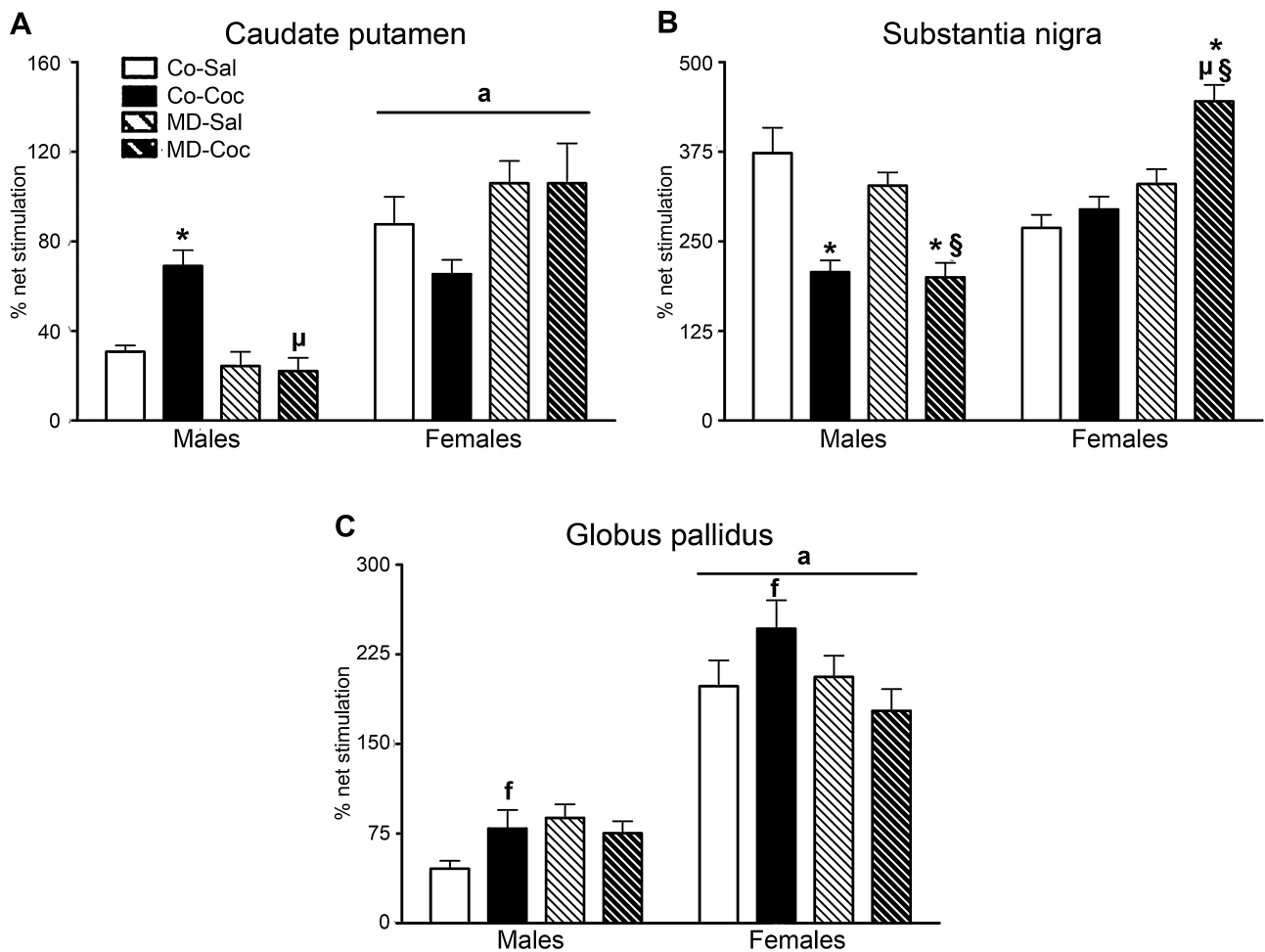


Fig. 3. CB1R functionality in caudate putamen (A), substantia nigra (B) and globus pallidus (C) of adult animals exposed to early life stress, maternal deprivation (MD, 24 h at pnd 9), or non stressed (control, Co) and administered during adolescence (from pnd 28 to 42) with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day). Histograms (mean ± S.E.M.) represent the percentage of net stimulation over basal activity. $n = 6-8$ per experimental group. Three-way ANOVA ($P < 0.05$), (a) significant overall effect of sex, (f) significant cocaine effect among control animals. Tukey post hoc comparisons: ^{*} $p < 0.05$ vs. Co-Sal of the same sex group, ^μ $p < 0.05$ vs. Co-Coc of the same sex group; [§] $p < 0.05$ vs. MD-Sal of the same sex group.

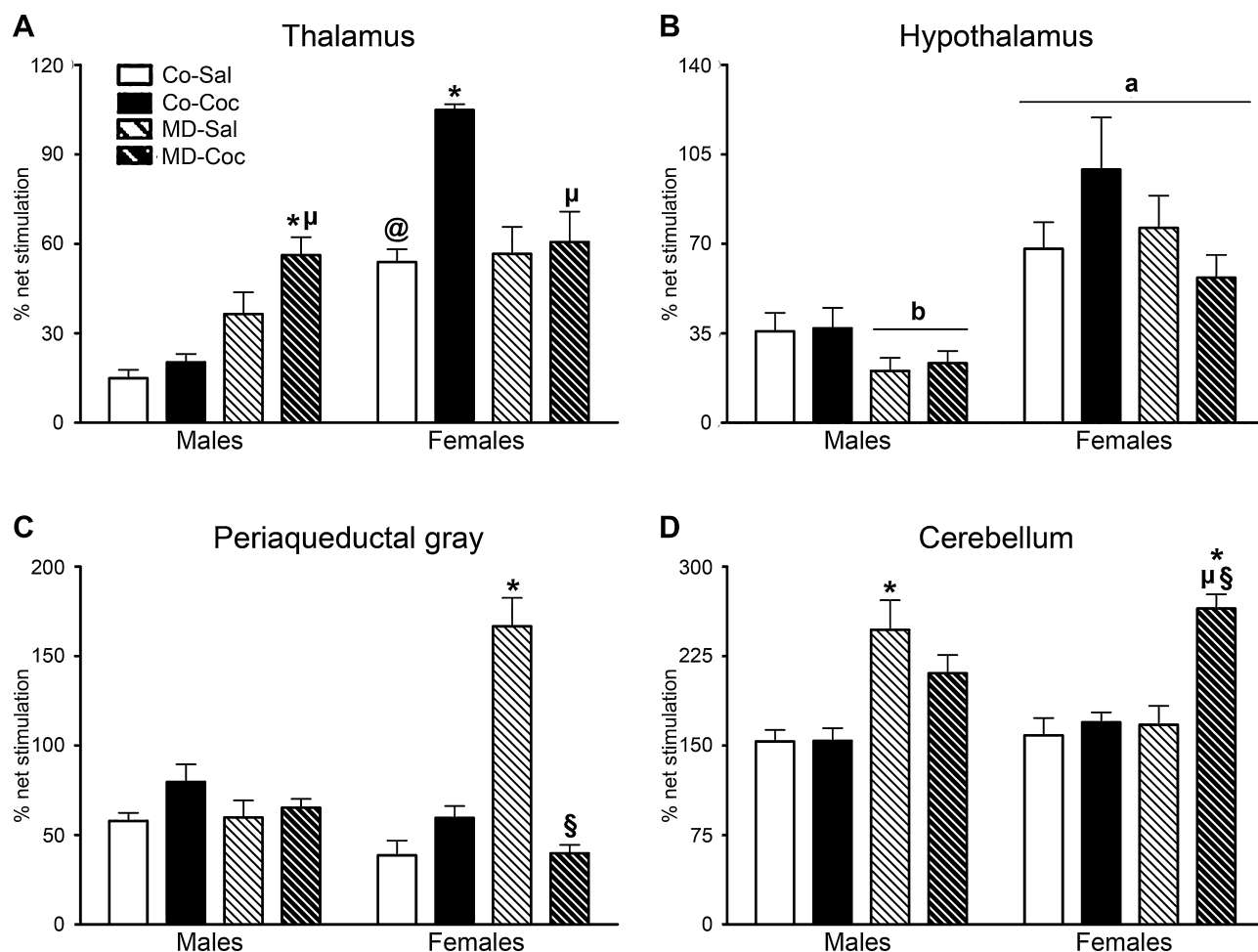


Fig. 4. CB1R functionality in thalamus (A), hypothalamus (B), periaqueductal gray (C) and cerebellum (D) of adult animals exposed to early life stress, maternal deprivation (MD, 24 h at pnd 9), or non stressed (control, Co) and administered during adolescence (from pnd 28 to 42) with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day). Histograms (mean \pm S.E.M.) represent the percentage of net stimulation over basal activity. $n=6-8$ per experimental group. Three-way ANOVA ($P<0.05$), (a) significant overall effect of sex, (b) significant MD effect within the same sex group. Tukey post hoc comparisons: @ $p<0.05$ vs. Co-Sal males, * $p<0.05$ vs. Co-Sal of the same sex group, $^{\mu}p<0.05$ vs. Co-Coc of the same sex group; § $p<0.05$ vs. MD-Sal of the same sex group.

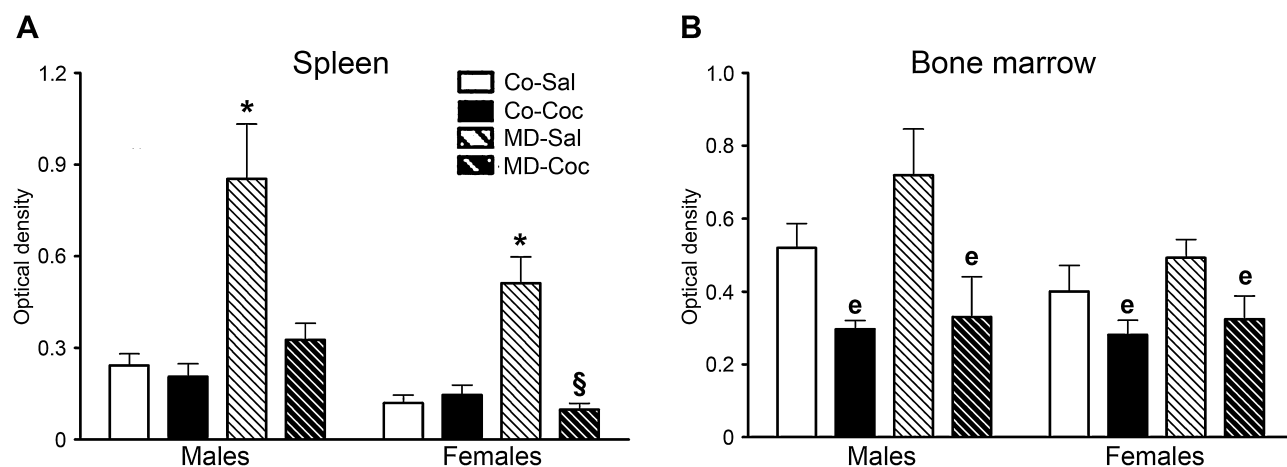


Fig. 5. CB2R expression in spleen (A) and bone marrow (B) of adult animals exposed to early life stress, maternal deprivation (MD, 24 h at pnd 9), or non stressed (control, Co) and administered during adolescence (from pnd 28 to 42) with saline (Sal) or cocaine (Coc, 8 mg/kg/day). Histograms (mean \pm S.E.M.) represent the optical density of the bands. $n=7-8$ per experimental group. Three-way ANOVA ($P<0.05$), (e) significant overall effect of cocaine. Tukey post hoc comparisons: * $p<0.05$ vs. Co-Sal of the same sex group; § $p<0.05$ vs. MD-Sal of the same sex group.

exclusively among females [$F(1,32)=11.96$, $p<0.01$] (Table 2). Instead, MD effects on cerebellum CB1R function only appeared among males, i.e., MD males exhibited the higher levels of CB1R net stimulation. In females, only the combination of treatments was able to significantly increase cerebellum CB1R function (Fig. 4D).

3.3. CB2R expression in immune tissues

Spleen CB2R expression (Fig. 5A) was analyzed by a three-way ANOVA. Significant interaction between neonatal condition and drug treatment was achieved [$F(1,54)=14.61$; $p<0.001$], as well as significant overall effects of sex [$F(1,54)=19.38$; $p<0.001$], neonatal condition [$F(1,54)=20.15$; $p<0.001$] and drug treatment [$F(1,54)=14.89$; $p<0.001$]. Post hoc comparisons performed for each sex indicated that MD provoked significantly increased spleen CB2R expression both in males and females, while adolescent cocaine abolished this effect, although statistical significance was only achieved for females.

In bone marrow, the three-way ANOVA of CB2R expression data (Fig. 5B) revealed a significant effect of drug treatment [$F(1,54)=20.68$; $p<0.001$]. Cocaine administration significantly diminished bone marrow CB2R expression independently of animals' sex and neonatal condition.

4. Discussion

Present results indicate that MD induces long-lasting effects in both central and peripheral CBRs. Adolescent cocaine administration modified CBRs in a sex and region-dependent manner, and certain cocaine effects were modulated by the neonatal events. As expected, sex differences in somatic growth were observed from adolescence until adulthood, and the MD episode provoked a drastic and immediate decrease in body weight gain. However, the effects of MD on body weight gain were not observed at the selected time windows, i.e., adolescence and adulthood, in contrast with previous studies [6,31,37]. Adolescent cocaine administration was devoid of effects on body weight gain, as previously reported [38]. Although chronic cocaine administration reduced body weight gain in adults [38] and adolescents administered with higher doses of the drug (10 mg/kg, twice daily) [39]. Surprisingly, after cocaine withdrawal a decrease in body weight gain was observed among control females while the opposite, a subtle increase in body weight gain, was observed among MD females providing further evidence for an altered energy homeostasis in MD animals [28,29].

4.1. Sexual dimorphisms in brain CB1R density and functionality

As already described [see [40,41] for review], sex differences in brain endocannabinoid system were found among control animals. Present findings demonstrate lower densities of CB1Rs in female hippocampus together with increased functional rates when compared to male samples; a sexually dimorphic pattern previously reported [42,43] that present research extends to PFC, CPu and GP. CB1R expression was also lower in the SN of female compared to male animals, and higher levels of CB1R functionality were found in the NAcc, amygdala, thalamus and hypothalamus of female animals compared to males. A similar change in CB1R binding was already reported for the amygdala, although discrepant results were achieved for hypothalamus and hippocampus [44]. Notwithstanding, both expression and functionality of CB1Rs were decreased in the VTA of females compared to male animals, possibly providing a neural substrate for the existing sex differences to the rewarding effects of cannabinoids [40]. In general, the sex differences in brain CB1R expression and functionality suggest a differential maturational endpoint of the endocannabinoid system that may underlie physiological sex differences as well as

the already reported divergent responses to exogenous cannabinoids [40,41]. It is worth mentioning that sex differences in gonadal hormones may also have influenced CB1R changes. Indeed, the adolescent brain is re-organized by gonadal steroid hormones during puberty [45], and some of the sexual dimorphisms described within the endocannabinoid system may result from the influenced of these hormonal waves [see [46] for review].

4.2. Effects of MD in brain CB1R density and functionality

Short-term effects of MD on the eCB system have been previously reported [18,19,47], and present findings provide evidence for long-term effects that last until adulthood. MD induced an increase in CB1R expression in the SN of both male and female animals. On the one hand, among males, MD provoked a remarkable decrease in CB1R function in NAcc, PFC and hypothalamus, as well as a reduction in CB1R expression within the thalamus. Notably, CB1R activity was only found to be increased within the cerebellum of adult males. On the other hand, among females, MD induced an increase in CB1R expression in the cerebellum and an increased CB1R functionality in the PAG. Worth mentioning comparable findings were achieved by using another animal model of early life stress, i.e., social isolation rearing, where the animals reared in isolation showed a reduced CB1R functionality in the PFC and NAcc, as reported for our MD animals, but also in CPu, hippocampus and VTA [48]. However, discrepancies exist between our study and a recent paper that reports no changes in CB1R density and functionality at adulthood [49] that can be due to the different rat species employed (*Wistar* or *Sprague–Dawley*) that it seems to be critical for the observation of changes in brain CB1Rs in animal models of early life stress [see also [48]].

The above reported changes in brain CB1R expression and functionality may underlie, at least in part, the behavioral outcomes of MD. The generalized increment in CB1R expression within the SN may underlie the motor effects of MD [6,8,29]. The decreased functionality of CB1Rs in the PFC may mediate cognitive deficits observed in MD animals [37,50,51], while the reduced functionality of CB1Rs within the NAcc may relate to the depressive symptoms [7] and to the lack of motivation for cocaine seeking recently described in MD male mice [52]. Similarly, hypothalamic changes of CB1R functionality may reflect impairments in energetic homeostasis and HPA axis [6,8,18,28,29]. Among females, the increase in CB1R functionality within the PAG may reflect the recently reported sex differences in MD-induced nociception; where the mechanical allodynia and the neuropathic pain resulting from MD were more markedly observed in females compared to males [5]. However, further research is needed to understand the precise behavioral correlations of the enduring changes in CB1R expression and functionality observed following an episode of MD.

4.3. Effects of adolescent cocaine exposure in control and MD animals

In males, a decrease in CB1R expression within the PFC was found, exclusively among control animals. Accordingly, a decrease in CB1R mRNA levels in the PFC of adult male rats chronically treated with cocaine was described, in the absence of changes in CB1R density [26]. Discrepancies between studies might be due to differences in the age of cocaine administration, in the dose and schedule of drug administration, and more importantly to differences in the length of the withdrawal period since cocaine long-term effects have been described as different (and even opposite) to those observed immediately after the treatment [53].

Adolescent cocaine administration induced an increase in CB1R functionality within VTA, hippocampus CPu and GP of male animals, and a similar increase in the GP and thalamus of females.

These changes may be associated with cocaine-induced locomotor responses in which striatal CB1Rs have been recently involved [23].

In contrast, a decrease in CB1R functionality was observed in the SN of Coc-treated male animals. Previous studies have reported no changes in brain eCB content following cocaine self-administration [27,54]. However, given the profuse interactions between eCB and dopamine neurotransmission [55,56], the presently reported changes in CB1R density and functionality may result from cocaine-induced changes in dopamine levels. Actually, most brain areas affected by adolescent cocaine administration are part of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopaminergic pathways. Moreover, the thalamus, an important integration node with profuse connections with brain dopaminergic areas [57], has been reported to be affected by adolescent cocaine administration among females. However, in the present study, an evaluation of the potential cocaine-induced changes in the dopaminergic system (i.e., dopamine levels and/or dopamine receptor expression) could not be afforded.

The combination of both insults, i.e., MD and adolescent cocaine administration, decreased CB1R functionality within the amygdala of male and female animals. Among females, the combination of treatments increase the functionality of CB1Rs within SN and cerebellum, and this same pattern was observed in the thalamus of males. Notably, within the thalamus and PAG of females, the application of the two manipulations normalized CB1Rs activity levels, as in the CPU of male animals, an effect that was slightly present in the VTA. Present findings suggest an abnormal development of the endocannabinoid system due to MD given the fact that adolescent cocaine administration induced divergent long-term changes in brain CB1Rs.

4.4. Peripheral CB2R expression

MD induced a persistent increment in spleen CB2R expression without modifying CB2R expression in bone marrow. Given that CB2Rs mediate immunosuppressive effects [see [58] for review]; the reported increase in spleen CB2R expression may contribute to the impairments in immune function previously described for MD animals [31,59]. However, further experiments are needed to explain how adolescent cocaine administration could prevent this MD effect. On the other hand, in this study, cocaine induced a generalized reduction in bone marrow CB2R expression. This result contrasts with previous findings reporting an increase in CB2R expression in distinct immune cells following cocaine self-administration [60], although discrepancies might be due to differences in the administration protocol (i.p. injections vs. self administration), and/or to tissue-specific effects of cocaine. Additionally, fluctuations in immune tissues' CB2R expression levels following cocaine administration and withdrawal cannot be excluded and may mediate, at least partially, the altered immune functionality reported after cocaine administration [13,14].

5. Conclusions

Present findings provide evidence for changes in brain CB1R expression and functionality and in immune CB2R expression as a consequence of early life stress and adolescent cocaine exposure as well as for functional interactions between both challenges, emphasizing that in many regions, these effects are sexually dimorphic.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Plan Nacional sobre Drogas Orden SAS/1250/2009, GRUPOS UCM-BSCH: 951579 and Red de trastornos adictivos RD06/0001/1013 to M.P. Viveros, and from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-064890); Ministerio de Sanidad y Consumo (RD06/001/0029 and RD2012/0028/0021 of Instituto de Salud Carlos III and Plan Nacional sobre Drogas 2008–2010); Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (S-SAL/0261/2006; Consorcio I+D CANNAB-CM); and UNED (Plan de Promoción de la Investigación) to E. Ambrosio. A. Llorente-Berzal is a predoctoral fellow of the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN).

References

- [1] Afifi TO, Enns MW, Cox BJ, Asmundson GJ, Stein MB, Sareen J. Population attributable fractions of psychiatric disorders and suicide ideation and attempts associated with adverse childhood experiences. *American Journal of Public Health* 2008;98:946–52.
- [2] Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry* 2001;49:1023–39.
- [3] Enoch MA. The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology* 2011;214:17–31.
- [4] Bellinger DL, Lubahn C, Lorton D. Maternal and early life stress effects on immune function: Relevance to immunotoxicology. *Journal of Immunotoxicology* 2008;5:419–44.
- [5] Burke NN, Llorente R, Marco EM, Viveros MP, Finn DP, Roche M. Early life stress in rats is associated with sex-dependent alterations in neuropathic pain behaviour and altered cytokine expression in the prefrontal cortex. In: 14th World Congress on Pain. 2012.
- [6] Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in wistar rats. *Stress* 2005;8:247–57.
- [7] Macri S, Laviola G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behavioural Brain Research* 2004;154:231–8.
- [8] Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros MP. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2009;33:498–507.
- [9] Miczek KA, Yap JJ, Covington 3rd HE. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology and Therapeutics* 2008;120:102–28.
- [10] Sinha R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology* 2001;158:343–59.
- [11] Büttner A, Mall G, Penning R, Sachs H, Weis S. The neuropathology of cocaine abuse. *Legal Medicine (Tokyo)* 2003;5(Suppl. 1):S240–2.
- [12] Nnadi CU, Mimiko OA, McCurtis HL, Cadet JL. Neuropsychiatric effects of cocaine use disorders. *Journal of the National Medical Association* 2005;97:1504–15.
- [13] Cabral GA. Drugs of abuse, immune modulation, and aids. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology* 2006;1:280–95.
- [14] Fox HC, D'Sa C, Kimmerling A, Siedlarz KM, Tuit KL, Stowe R, et al. Immune system inflammation in cocaine dependent individuals: implications for medications development. *Human Psychopharmacology* 2012;27:156–66.
- [15] SAMHSA. Results from the 2010 national survey on drug use and health: summary of national findings. 2011.
- [16] Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005: 299–325.
- [17] Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British Journal of Pharmacology* 2010;160:467–79.
- [18] Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, et al. Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Developmental Neurobiology* 2008;68:1334–47.
- [19] Suárez J, Rivera P, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, et al. Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-ag biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Research* 2010;1349:162–73.
- [20] Parolaro D, Rubino T. The role of the endogenous cannabinoid system in drug addiction. *Drug News and Perspectives* 2008;21:149–57.
- [21] Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, et al. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1670–80.
- [22] Xi ZX, Spiller K, Pak AC, Gilbert J, Dillon C, Li X, et al. Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects: experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:1735–45.

- [23] Corbille AG, Valjent E, Marsicano G, Ledent C, Lutz B, Herve D, et al. Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. *Journal of Neuroscience* 2007;27:6937–47.
- [24] De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, et al. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nature Medicine* 2001;7:1151–4.
- [25] Xi ZX, Gilbert JG, Peng XQ, Pak AC, Li X, Gardner EL. Cannabinoid CB1 receptor antagonist am251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience* 2006;26:8531–6.
- [26] Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Sparpaglione V, Parolaro D, Ramos JA. Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB(1) receptor binding and mRNA levels. *Drug and Alcohol Dependence* 2002;66:77–84.
- [27] Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Research* 2002;954:73–81.
- [28] Viveros MP, Llorente R, Díaz F, Romero-Zerbo SY, Bermúdez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, et al. Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Hormones and Behavior* 2010;58:808–19.
- [29] Viveros MP, Llorente R, Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermúdez-Silva F, De la Fuente M, et al. Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(Suppl. 1):S217–26.
- [30] Anker JJ, Zlebnik NE, Navin SF, Carroll ME. Responding during signaled availability and nonavailability of iv cocaine and food in rats: age and sex differences. *Psychopharmacology* 2011;215:785–99.
- [31] Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, et al. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:636–50.
- [32] Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1995;19:39–51.
- [33] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier Academic; 2005.
- [34] Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, et al. Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *Journal of Comparative Neurology* 2008;509:400–21.
- [35] Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1576:255–64.
- [36] Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry* 1995;232:54–61.
- [37] Marco EM, Valero M, de la Serna O, Aisa B, Borcel E, Ramirez MJ, et al. Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology* 2013;68:223–31.
- [38] Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis R, Spear LP. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995;275:345–57.
- [39] Planeta CS, Marin MT. Effect of cocaine on periadolescent rats with or without early maternal separation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002;35:1367–71.
- [40] Craft RM, Marusich JA, Wiley JL. Sex differences in cannabinoid pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life Sciences* 2013;92:476–81.
- [41] Fattore L, Fratta W. How important are sex differences in cannabinoid action? *British Journal of Pharmacology* 2010;160:544–8.
- [42] Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, Llorente R, et al. Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB(1) cannabinoid receptors. *Journal of Psychopharmacology* 2010;25:1676–90.
- [43] Reich CG, Taylor ME, McCarthy MM. Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. *Behavioural Brain Research* 2009;203:264–9.
- [44] Riebe CJ, Hill MN, Lee TT, Hillard CJ, Gorzalka BB. Estrogenic regulation of limbic cannabinoid receptor binding. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:1265–9.
- [45] Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL. Back to the future: the organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Hormones and Behavior* 2009;55:597–604.
- [46] Viveros MP, Marco EM, Lopez-Gallardo M, Garcia-Segura LM, Wagner EJ. Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2011;35:1740–51.
- [47] Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, et al. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 2009;19:623–32.
- [48] Zamberletti E, Viganò D, Guidali C, Rubino T, Parolaro D. Long-lasting recovery of psychotic-like symptoms in isolation-reared rats after chronic but not acute treatment with the cannabinoid antagonist AM251. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2012;15:267–80.
- [49] Zamberletti E, Prini P, Speziali S, Gabaglio M, Solinas M, Parolaro D, et al. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience* 2012;204:245–57.
- [50] Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, et al. Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 2011;23:329–44.
- [51] Llorente-Berzal A, Mela V, Borcel E, Valero M, Lopez-Gallardo M, Viveros MP, et al. Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. *Neuropharmacology* 2012;62:1332–41.
- [52] Martini M, Valverde O. A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology* 2012;219:149–58.
- [53] Pickens CL, Airavaara M, Theberge F, Fanous S, Hope BT, Shaham Y. Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends in Neurosciences* 2011;34:411–20.
- [54] Caille S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *Journal of Neuroscience* 2007;27:3695–702.
- [55] Fernández-Ruiz J, Hernández M, Ramos JA. Cannabinoid–dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 2010;16:e72–91.
- [56] Wiskerke J, Pattij T, Schoffelmeier AN, De Vries TJ. The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addiction Biology* 2008;13:225–38.
- [57] Smith Y, Raju D, Nanda B, Pare JF, Galvan A, Wichmann T. The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Research Bulletin* 2009;78:60–8.
- [58] Pacher P, Mechoulam R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Progress in Lipid Research* 2011;50:193–211.
- [59] De la Fuente M, Llorente R, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, et al. Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009;1153:176–83.
- [60] Assis M, Llorente A, Higuera-Matas A, Coria S, Montoya G, Miguéns M, et al. Expresión de CB2 en células inmunes en modelos de patología dual. 2ª Reunión conjunta Red de Trastornos Adictivos (RTA) – Sociedad Española de Neurociencia (SENC) – Cibersam, Salamanca, Spain, 2011: pp. 25 (O14).

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

El consumo de cocaína entre la población juvenil es un problema sanitario público de orden mundial con importantes complicaciones neuroinmunológicas cuyos efectos pueden depender de una exposición previa a eventos estresantes, particularmente en etapas tempranas del desarrollo. La combinación de los dos modelos animales empleados en el presente estudio (SM y exposición a cocaína en edad adolescente) puede contribuir a aclarar la participación del SEC en las alteraciones a largo plazo inducidas por la exposición a ambas situaciones

Como cabía esperar, la SM produjo una disminución drástica del peso corporal a DP 10, 24 horas después del inicio del estrés neonatal. También, desde la adolescencia a la etapa adulta se encontraron diferencias sexuales en el crecimiento somático. Es muy probable que la SM produjera cambios en la ganancia de peso corporal tal y como hemos visto en estudios previos; sin embargo, durante la ventana temporal que elegimos para monitorizar el peso de los animales no observamos ningún efecto de nuestro protocolo de SM. Tampoco observamos ningún efecto de la administración de cocaína durante el periodo de administración, i.e. la adolescencia. Sin embargo, sorprendentemente, encontramos que tras el cese del tratamiento con cocaína se produjo una disminución de la ganancia de peso corporal entre las hembras control mientras que se observó lo contrario entre las hembras SM (un sutil aumento de la ganancia de peso corporal).

En el presente trabajo encontramos asimismo una serie de diferencias sexuales en el patrón de expresión y de funcionalidad de los receptores CB1 cerebrales de los animales controles. Las hembras presentaban una menor densidad y una mayor funcionalidad de receptores CB1 en el hipocampo, el córtex prefrontal, el caudado putamen y el globo pálido cuando las comparamos con los machos. También se encontraron en las hembras unos mayores niveles de funcionalidad del receptor CB1 en el núcleo accumbens, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo que en los machos. Sin embargo, la expresión de los receptores CB1 fue menor en la sustancia negra de las hembras con respecto a la de los animales macho, y en el área tegmental ventral se vio

que tanto los niveles de expresión como de funcionalidad de los receptores CB1 fueron mayores en los machos que en las hembras.

La SM, *per se*, causó un aumento de la expresión de receptores CB1 en la sustancia negra tanto de animales macho como de animales hembra. Entre los machos, la SM produjo una disminución significativa de la funcionalidad del receptor CB1 en el núcleo accumbens, el córtex prefrontal y el hipotálamo, así como una reducción de la expresión del receptor CB1 en el tálamo. Es importante señalar que la actividad del receptor CB1 sólo se vio incrementada en el cerebelo de los machos adultos. Por otro lado, entre las hembras, la SM produjo un aumento de la expresión del receptor CB1 en el cerebelo y un aumento de su funcionalidad en la sustancia gris periacueductal.

El tratamiento durante la adolescencia con cocaína produjo, entre los machos, una disminución de la expresión de receptores CB1 en el córtex prefrontal y un aumento de la funcionalidad en el área tegmental ventral, el hipocampo, el caudado putamen y el globo pálido. En la sustancia negra de los animales macho control el tratamiento con cocaína provocó una disminución de la actividad del receptor CB1. Entre las hembras, por otro lado, el tratamiento farmacológico adolescente causó a largo plazo un incremento de la funcionalidad del receptor CB1 en el globo pálido y el tálamo.

La combinación de ambos tratamientos provocó una disminución de la funcionalidad del receptor CB1 en la amígdala tanto de animales macho como de animales hembra. Entre las hembras, la combinación de ambos tratamientos incrementó la funcionalidad de los receptores CB1 en la sustancia negra y el cerebelo, y este mismo patrón se observó en el tálamo de los machos. En el tálamo y la sustancia negra periacueductal de las hembras, la aplicación de ambas manipulaciones normalizaron los niveles de actividad de los receptores CB1, al igual que en el caudado putamen de los animales macho.

En lo referente a la expresión del receptor CB2 en tejido inmune, observamos que la SM produjo un incremento de la expresión de este receptor en el bazo, mientras que el tratamiento adolescente con cocaína causó una normalización de sus niveles en los animales SM. En la médula ósea observamos cómo el tratamiento farmacológico

con cocaína durante la adolescencia produjo una disminución persistente de la expresión del receptor CB2.

Los resultados de este experimento muestran que el estrés en etapas tempranas del desarrollo y la exposición a un psicoestimulante como la cocaína durante la adolescencia provocan cambios a largo plazo en la expresión y funcionalidad del receptor CB1 en el cerebro y en la expresión del receptor CB2 en tejido inmune. Asimismo se describen interesantes interacciones funcionales entre el estrés neonatal y la exposición a la droga y se enfatiza el hecho de que en varias regiones los efectos de ambas manipulaciones son sexo-dependientes. Las diferencias sexuales “basales” que encontramos en los animales controles, y que afectan tanto a la expresión como a la actividad de los receptores CB1 cerebrales podrían contribuir a explicar los efectos sexodimórficos de los tratamientos utilizados.

BLOQUE II

Efectos, a largo plazo, de la exposición en edad adolescente a THC y/o a MDMA: Dimorfismos sexuales

Análisis neuroconductuales y endocrinos

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es una droga con propiedades psicoestimulantes comúnmente conocida como éxtasis. Su consumo produce una rápida liberación e inhibición de la recaptura de serotonina aunque también afecta a otros neurotransmisores como la dopamina y la norepinefrina (Beveridge *et al.*, 2004; Cunningham *et al.*, 2009) y origina un marcado incremento de la actividad metabólica, aumentando los niveles de radicales libres y provocando un mayor estrés oxidativo (Zhou *et al.*, 2003). En los seres humanos, los efectos a corto plazo de la MDMA duran entre 3 y 5 horas e incluyen euforia, relajación, aumento de la sociabilidad, empatía y un incremento de la energía (Gouzoulis-Mayfrank y Daumann, 2009; Ludwig *et al.*, 2008). Fisiológicamente, los consumidores de éxtasis también exhiben una desregulación de la temperatura corporal y una pérdida de peso (Shen *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2007; Piper, 2007; Piper y Meyer, 2004). El consumo de MDMA puede también causar problemas a largo plazo sobre el estado de ánimo y sobre la cognición tales como un aumento de la impulsividad, déficits de la memoria, ansiedad y depresión (Quednow *et al.*, 2006, 2007; Parrott, 2001; Curran *et al.*, 1997; Steele *et al.*, 1994).

El éxtasis es ampliamente consumido como una droga recreativa y el perfil de sus consumidores es normalmente el de adolescentes o adultos jóvenes (EMCDDA, 2012) que asisten a fiestas “rave” o a clubes de música “dance” (Parrott, 2004). Asimismo, la mayoría son normalmente consumidores de otras drogas de abuso y consumen la MDMA durante los fines de semana en combinación con otras sustancias adictivas (Robledo, 2010; Senn *et al.*, 2007), fenómeno conocido como policonsumo.

El cannabis es la droga ilegal más ampliamente consumida entre los adolescentes y los adultos jóvenes (Malone *et al.*, 2010; Rubino y Parolaro, 2008). Se obtiene a partir de extractos del arbusto *Cannabis sativa* donde se han encontrado al menos más de 80 compuestos; sin embargo, se piensa que los efectos psicotrópicos de la

planta se deben sobre todo a uno de ellos, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Klein *et al.*, 2011; Bossong y Niesink, 2010). El THC ejerce sus efectos a través de la activación del receptor cannabinoide CB1 localizado principalmente en el sistema nervioso central (Klein *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2006; Malone y Taylor, 2006).

Se ha visto que la administración crónica de agonistas del receptor CB1 en ratas adolescentes produce alteraciones a largo plazo de los procesos cognitivos y emocionales durante la etapa adulta al igual que cambios conductuales que se asemejan a una sintomatología de tipo psicótico (Mateos *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2006; Biscaia *et al.*, 2003; Schneider y Koch, 2003). Durante la adolescencia continúa el desarrollo del cerebro, incluyendo la maduración y reorganización de los sistemas de neurotransmisores (Quinn *et al.*, 2008; Romeo, 2003; Spear, 2000), entre los que destaca el sistema endocannabinoide (SEC). De hecho, en esta etapa se observa una alta densidad de receptores CB1 en diversas estructuras cerebrales (Rodríguez de Fonseca, 1993). Es más, el SEC juega un papel crítico en los procesos de neurodesarrollo (Díaz-Alonso *et al.*, 2012; Gaffuri *et al.*, 2012). Por tanto, parece factible que las alteraciones funcionales del SEC debidas al consumo de cannabis o a la exposición de agonistas cannabinoideos durante este período crítico ejerzan efectos sustanciales sobre la maduración y el normal funcionamiento de los circuitos del cerebro en desarrollo, cuyos efectos deletéreos podrían aparecer posteriormente en la vida del individuo (Gleason *et al.*, 2012; Malone *et al.*, 2010; Fernández-Espejo *et al.*, 2009; Marco y Viveros, 2009; Rubino y Parolaro, 2008).

Durante los últimos años se ha producido un aumento del policonsumo de drogas de abuso entre los jóvenes. En particular, el cannabis es la droga de abuso que con mayor frecuencia se consume conjuntamente con la MDMA, especialmente entre los adultos jóvenes (Schulz, 2011; Parrot *et al.*, 2007; Sala y Braida, 2005). Por ejemplo, Wish *et al.* (2006) encuestaron a una muestra de estudiantes universitarios de la Costa Este de los Estados Unidos y encontraron que el 98% de los consumidores de éxtasis también habían consumido cannabis. La motivación por el policonsumo podría verse influenciada por aspectos psicofisiológicos. Por ejemplo, en contraste con los efectos iniciales de empatía y euforia tras la administración aguda, una disminución de la concentración de MDMA en el cerebro puede provocar una sintomatología de tipo

disfórico como por ejemplo ansiedad, agitación, insomnio y depresión. De esta manera, el cannabis podría consumirse para intentar paliar la presencia de estos estados negativos, tanto fisiológicos como emocionales, asociados al “bajón” del éxtasis [ver como revisión Shulz *et al.* (2011) y Parrott *et al.* (2007)]. En cualquier caso, la frecuente combinación de cannabis y éxtasis por parte de los jóvenes es preocupante y merece investigarse el impacto neurobiológico asociado a su uso combinado, no sólo a corto, sino también a largo plazo.

Dos estudios previos han investigado los efectos de la coadministración de THC y MDMA a corto plazo sobre animales adultos (Young *et al.*, 2005; Morley *et al.*, 2004), y también se ha descrito el efecto combinado de estas dos drogas sobre el paradigma de la preferencia condicionada de lugar (CPP, del inglés *Conditioned place preference*; Robledo *et al.*, 2007). Sin embargo, son escasos los trabajos que hayan estudiado los efectos de una exposición crónica a ambas sustancias y que nosotros sepamos, el único trabajo publicado sobre los efectos de la administración crónica durante la adolescencia de una combinación de tratamientos con MDMA y THC se realizó utilizando sólo animales macho (Shen *et al.*, 2011).

Las diferencias sexuales no sólo afectan a la fisiología reproductora sino a muchos otros aspectos psicobiológicos, incluyendo la adicción (Viveros *et al.*, 2006, 2009, 2011; Carroll y Anker, 2010; Lynch, 2006). En este contexto, los estudios clínicos han demostrado que las hembras son más susceptibles a los efectos de las drogas de abuso (Carroll *et al.*, 2004). Nosotros hemos estudiado exhaustivamente las diferencias sexuales tras un tratamiento crónico durante la adolescencia con un agonista del receptor cannabinoide (Viveros *et al.*, 2011; Mateos *et al.*, 2010; Biscaia *et al.*, 2003). Sin embargo, sólo unos pocos estudios se han centrado en las diferencias sexuales en respuesta a la MDMA (Walker *et al.*, 2007; Bubenikova *et al.*, 2005; Palenicek *et al.*, 2005), y no hemos encontrado ninguna publicación con un estudio preclínico que haya analizado las diferencias sexuales en los efectos de la administración crónica de MDMA durante la adolescencia.

En base a las investigaciones previamente descritas, diseñamos un protocolo experimental en el que ratas de ambos sexos fueron tratadas crónicamente con una dosis creciente de THC (Rubino *et al.*, 2008) y/o con MDMA siguiendo un modelo animal

modificado de consumo de fin de semana (Meyer *et al.*, 2008). Dado que se ha visto que ambos, el THC y la MDMA, producen una alteración de la termorregulación, se tomaron medidas de la temperatura corporal tras el primer y el último día de tratamiento con MDMA a diferentes tiempos. A corto plazo (un día tras el final del tratamiento) los animales fueron sometidos al tablero con agujeros (TCA), un test que proporciona medidas independientes de actividad locomotora y de exploración dirigida a estímulos (los agujeros del aparato), y al laberinto en cruz elevado (LCE) que ha sido validado para la evaluación de la ansiedad en roedores (Pellow *et al.*, 1985). En la etapa adulta, se sometió a los animales al test de reconocimiento de objetos (NOT, del inglés *Novel object test*) para evaluar posibles alteraciones de la memoria de trabajo a largo plazo (Ennaceur y Delacour, 1988) y al test de la inhibición prepulso (PPI, del inglés *Prepulse inhibition*), una prueba que sirve para evaluar posibles alteraciones en la capacidad de “filtrado” de información sensorial y déficit de la capacidad de atención (Geyer *et al.*, 2001).

Se ha visto que existen una gran cantidad de sistemas de señalización intracelular implicados en las respuestas conductuales producidas por los cannabinoides y la MDMA. Por ejemplo, las fosfoquinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2 (pERK 1/2, del inglés *extracellular signal-regulated kinases*) se encuentran moduladas en el cerebro de rata por un tratamiento crónico con THC (Rubino *et al.*, 2004) o por una administración con MDMA (Di Benedetto *et al.*, 2011). Se ha relacionado la modulación de esta vía de señalización con las alteraciones producidas sobre el estado de ánimo y con el comportamiento relacionado con la ansiedad (Qi *et al.*, 2009). Por otro lado, el gen de expresión inmediata de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc, del inglés *activity-regulated cytoskeleton associated protein*) se traduce en una proteína citosólica implicada en los mecanismos de plasticidad sináptica asociados con la potenciación a largo plazo y el aprendizaje (Bramham *et al.*, 2010). Se ha visto que la expresión del ARNm para Arc se encuentra enormemente modulada por la MDMA en las regiones corticales y en el hipocampo de las ratas (Beveridge *et al.*, 2004). De acuerdo con esta información, también medimos la expresión de pERK 1/2 y de Arc en el hipocampo y la corteza prefrontal. Además, también se analizó la expresión de ARNm para prepro-orexina en el hipotálamo ya que su expresión se encuentra modulada por la alimentación (Cai *et al.*, 1999) y el THC y la

MDMA tienen propiedades orexigénicas y anorexigénicas respectivamente. También se midió el peso corporal a lo largo del estudio y los niveles circulantes de leptina y corticosterona, dos hormonas que responden a ambos, los cannabinoides (Hill y Tasker, 2012) y la MDMA (Graham *et al.*, 2010; Kobeissy *et al.*, 2008).

Análisis inmunohistoquímico

El análisis neuroconductual y endocrino expuesto en el anterior epígrafe, aporta uno de los pocos estudios acerca de los efectos a largo plazo de la combinación de THC y MDMA durante la adolescencia, y el primero en comparar sus efectos entre machos y hembras. En el siguiente estudio, realizamos un análisis inmunohistoquímico del hipocampo y la corteza parietal de estos animales. En particular, nos centramos en las células gliales (astrocitos y microglía) y sobre el transportador de serotonina (SERT) y el receptor CB1. A continuación detallamos el porqué de la elección de estos parámetros.

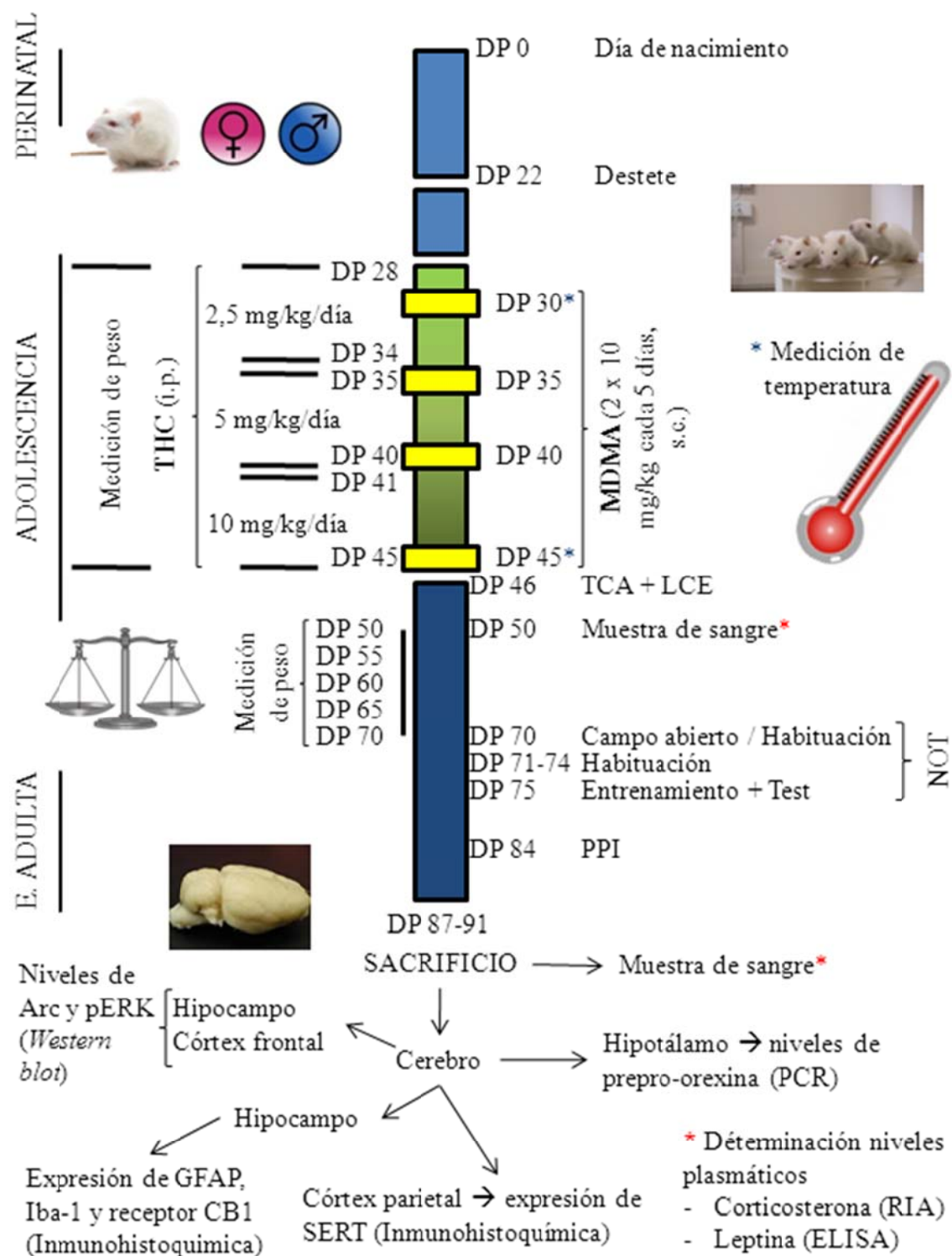
El SEC, a través del receptor CB1, está implicado en múltiples funciones, entre las que podemos destacar el desarrollo neuronal (Keimpema *et al.*, 2011), la inflamación (Massi *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2008) y la regulación de respuestas de ansiedad y estrés (Viveros *et al.*, 2005a, 2007a, 2011) entre otros muchos aspectos de la homeostasis (Marco *et al.*, 2012). Además, estudios previos han demostrado que la administración crónica del agonista cannabinoide CP-55,940 (CP) durante la adolescencia produce cambios neuroquímicos a largo plazo en el cerebro, como alteraciones en la actividad y expresión de los receptores CB1, o como hemos señalado en el capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral una disminución de los niveles de BDNF en esta misma región cerebral (López-Gallardo *et al.*, 2012; Mateos *et al.*, 2011). En lo referente a la participación del SEC sobre el control de la neuroinflamación, se ha visto que las células gliales, astrocitos y microglía, presentan receptores cannabinoides (Stella, 2010) que contribuyen a la modulación de la respuesta inflamatoria. Marchalant *et al.* (2007) demostraron que un tratamiento con el agonista del receptor CB1 WIN55212,2, causa una disminución en el número de células de microglía activada tras un tratamiento con LPS, lo que sugiere que el SEC podría jugar un papel importante en

el control de la reactividad de la microglía en respuesta a un agente adverso. En lo referente a los astrocitos, en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral describimos cómo un tratamiento crónico durante la adolescencia con CP incrementó *per se* el número de células GFAP+ en el giro dentado de los machos y revirtió la reactividad astrocítica producida por la SM en CA3 y el giro dentado.

Por otro lado, uno de los efectos más conocidos y ampliamente estudiados de la exposición a MDMA en ratas es un déficit de marcadores serotoninérgicos en diversas regiones cerebrales, tales como el estriado, el hipocampo y la corteza (Piper *et al.*, 2007; Battaglia *et al.*, 1991). Otros indicadores de alteraciones producidas por la MDMA son marcadores de neurotoxicidad, tales como la tasa de muerte celular (Schmued, 2003), los niveles de GFAP (Frau *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2002), y la neuroinflamación, medida vía activación de células de microglía (Connor *et al.*, 2005; Monks *et al.*, 2004). A pesar de que se sabe que el consumo de MDMA durante la adolescencia provoca diversas alteraciones conductuales a largo plazo sobre el estado de ánimo y la función cognitiva (Piper *et al.*, 2007), existe una escasez de datos sobre los efectos a largo plazo de la neurotoxicidad causada por la administración adolescente de MDMA.

Nuestro objetivo con el presente estudio inmunohistoquímico fue comprobar los efectos a largo plazo y dependientes del sexo del tratamiento crónico combinado de THC y MDMA durante la adolescencia sobre marcadores de astrocitos, de la microglía reactiva y de la neurotoxicidad serotoninérgica así como cambios en la expresión de los receptores CB1 hipocampales. Como expondremos en la correspondiente sección de la Discusión, hemos intentado relacionar, en la medida de lo posible, los efectos sobre estos parámetros con las alteraciones conductuales reportadas en el estudio neuroconductual y endocrino.

DISEÑO EXPERIMENTAL



PLOS ONE Decision: Accept [PONE-D-13-27080R2]

4 mensajes

PLOS ONE <plosone@plos.org>

19 de septiembre de 2013 07:20

Para: Maria-Paz Viveros <pazviver@bio.ucm.es>

PONE-D-13-27080R2

Sex dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption

PLOS ONE

Dear dR. Maria-Paz Viveros,

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE.

Your manuscript will now be passed on to our Production staff, who will check your files for correct formatting and completeness. After this review, they may return your manuscript to you so that you can make necessary alterations requested by the Production staff.

Before uploading, you should check the PDF of your manuscript very closely. THERE IS NO AUTHOR PROOFING. You should therefore consider the corrected files you upload now as equivalent to a production proof. The text you supply at this point will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you supply it. This is your last opportunity to correct any errors that are present in your manuscript files.

In addition, now that your manuscript has been accepted, please log into EM at <http://www.editorialmanager.com/pone>, click the "Update My Information" link at the top of the page, and update your user information to ensure an efficient production and billing process. If you have any questions about billing, please contact authorbilling@plos.org.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance. We no longer routinely supply publication dates to authors; if you need to know your paper's publication date for media purposes, you must coordinate with our press team. Your manuscript will remain under a strict press embargo until the publication date and time. For more information please contact onepress@plos.org.

Please contact one_production@plos.org if you have any other questions or concerns. Thank you for submitting your work to PLOS ONE.

With kind regards,
Yael Abreu-Villaça, Ph.D.
Academic Editor
PLOS ONE

PLOS ONE PONE-D-13-27080R2 10.1371/journal.pone.0078386 - Sent to Production

1 mensaje

Brooke Dabalos <brooke.dabalos@zyggroup.com>

24 de septiembre de 2013
01:49

Para: Maria-Paz Viveros <pazviver@bio.ucm.es>

Dear Professor Viveros,

"Sex dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption" has been accepted for production and will require no further action from you.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance at onepress@plos.org. Your manuscript will remain under a strict press embargo until the date and time of publication. We no longer routinely provide publication dates. If you need to know your paper's publication date for media purposes, you must coordinate with our press team via email to onepress@plos.org.

If you do not have press plans but wish to know the publication date of your manuscript, please contact one_production@plos.org.

We encourage you to sign up for a PLOS Journals account. You can find out more here: <http://www.plosone.org/static/help.action#account>.

Please contact one_production@plos.org if you have any questions or concerns. We thank you again for your contribution to PLOS ONE.

Sincerely,

PLOS ONE Production Team

Title: Sex dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption

Authors: Alvaro Llorente-Berzal^{ab}, Emma Puighermanal^c, Aurelijus Burokas^c, Andrés Ozaita^c, Rafael Maldonado^{c*}, Eva M. Marco^{ab}, María-Paz Viveros^{ab*}

Affiliations:

^aDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ Jose Antonio Novais 12, 28040 Madrid (Spain). ^bInstituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), C/ Profesor Martín Lagoss/n, 28040, Madrid (Spain). ^cLaboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de Salut, Universitat Pompeu Fabra, PRBB, C/ Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona (Spain).

***Corresponding authors:**

Professor María-Paz Viveros Hernando
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II),
Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Complutense de Madrid,
Ciudad Universitaria,
C/ José Antonio Novais nº 12, 28040 Madrid, Spain.
Phone: +34-913944993/4939; Fax: +34-913944935;
e-mail: pazviver@bio.ucm.es

Professor Rafael Maldonado
Laboratori de Neurofarmacologia,
Universitat Pompeu Fabra,
Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB),
C/ Dr Aiguader nº 88, 08003 Barcelona, Spain.
Phone: +34-933160824; Fax: +34-933160901.
e-mail: rafael.maldonado@upf.edu

Short Title: Long term impact of adolescent THC & MDMA consumption in rats

Abstract

Ecstasy is a drug that is usually consumed by young people at the weekends and frequently, in combination with cannabis. In the present study we have investigated the long-term effects of administering increasing doses of delta-9-tetrahydrocannabinol [THC; 2.5, 5, 10 mg/kg; i.p.] from postnatal day (pnd) 28 to 45, alone and/or in conjunction with 3,4-methylenedioxymethamphetamine [MDMA; two daily doses of 10 mg/kg every 5 days; s.c.] from pnd 30 to 45, in both male and female Wistar rats. When tested one day after the end of the pharmacological treatment (pnd 46), MDMA administration induced a reduction in directed exploration in the holeboard test and an increase in open-arm exploration in an elevated plus maze. In the long-term, cognitive functions in the novel object test were seen to be disrupted by THC administration to female but not male rats. In the prepulse inhibition test, MDMA-treated animals showed a decrease in prepulse inhibition at the most intense prepulse studied (80 dB), whereas in combination with THC it induced a similar decrease at 75 dB. THC decreased hippocampal Arc expression in both sexes, while in the frontal cortex this reduction was only evident in females. MDMA induced a reduction in ERK1/2 immunoreactivity in the frontal cortex of male but not female animals, and THC decreased prepro-orexin mRNA levels in the hypothalamus of males, although this effect was prevented when the animals also received MDMA. The results presented indicate that adolescent exposure to THC and/or MDMA induces long-term, sex-dependent psychophysiological alterations and they reveal functional interactions between the two drugs. **Keywords:** Cannabis; Ecstasy; Adolescence; Sexual-dimorphisms; Cognition; Emotion

Introduction

MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) is a psychostimulant drug commonly known as ecstasy. This drug induces rapid release of serotonin and inhibition of its reuptake, as well as affecting other neurotransmitters, such as dopamine and norepinephrine [1,2]. It also produces a marked increase in metabolic activity, free radical production and oxidative stress [3]. The acute effects of MDMA last for 3 to 5 hours in humans, and they include euphoria, relaxation, an increase in sociability, empathy and energy [4,5]. Ecstasy users also show other physiological modifications, such as body temperature deregulation and weight loss [6,7]. In the long-term, heavy MDMA use can lead to mood and cognitive problems, including impulsivity, memory deficits, anxiety and depression [3,8,9]. Ecstasy is a widely used recreational drug that is commonly consumed by teenagers and young adults [10] who self-administer the drug at raves and dance club venues [3]. Most ecstasy users are polydrug users who consume MDMA at weekends in combination with other drugs of abuse, including cannabis [11,12].

Cannabis is the illicit drug most commonly used by adolescents and young adults [13,14], and its main psychoactive compound is delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) [13]. THC mainly exerts its psychoactive effects through the activation of CB1 cannabinoid receptors primarily located in the central nervous system. CB1 receptors are most prominent during adolescence [19] when important rearrangements of neurotransmitter systems occur. Indeed, the chronic activation of CB1 receptors during adolescence has been reported to induce cognitive impairments and emotional alterations in adulthood, these resembling psychotic-like symptoms in both humans and animal models [15-18]. Therefore, cannabis consumption during this critical period, i.e. adolescence, could exert profound effects on the maturation and normal function of the circuits in the developing brain, the deleterious effects of which would be noticeable in later life [13,14].

Polydrug use among young people is a very frequent phenomenon and it has increased in recent years. In particular, cannabis is the most widely consumed illegal co-drug in MDMA users, especially among younger adults [21,22]. In a recent study of college students from the East Coast of the United States, 98% of ecstasy users had also consumed cannabis [23]. The motivation for polydrug use might be influenced by psychophysiological aspects, since decreasing concentrations of MDMA in the brain can lead to dysphoric symptoms including anxiety, agitation, insomnia and depression. Cannabis use might be considered as an attempt to relieve the negative symptoms associated with the “come-down” from ecstasy (see [21] and [22] for review). Whatsoever, the frequent combination of THC and MDMA by young people is a cause of concern, and the impact of this combination on later adult life deserves further study.

Previous studies have focused on the neurochemical and behavioral effects of the acute co-administration of THC and MDMA in adult rodents [24-26]. However, research on chronic exposure to this drug combination is very scarce and to the best of our knowledge, the only study published on the effects of the chronic exposure to MDMA and THC during adolescence refers only to male rats [27]. Sex-differences affect multiple psychobiological aspects of addiction [28-31] and indeed, clinical studies have shown that females are more susceptible to the effects of drugs of abuse than males [31]. We have extensively studied sexual dimorphisms after chronic cannabinoid treatment during adolescence [15-17,20,28]. However, only a few studies have focused on sexual dimorphism of adults in response to MDMA [7,32,33] and not on adolescent animals.

On the basis of our earlier findings, we designed an experimental protocol in which adolescent rats of both sexes were treated chronically with increasing doses of THC [34] and/or MDMA following a weekend consumption schedule [35]. Body temperature was evaluated after the first and last day of MDMA administration and one day after the end of the pharmacological treatment, animals were tested in the holeboard test as an independent

measure of motor activity and site-directed exploration, and in the elevated plus maze for the evaluation of anxiety-like responses [36]. As adults, the animals were also tested in the novel object recognition test to assess working memory [37], and with the prepulse inhibition of acoustic startle to evaluate attention abilities [38]. In order to correlate these behavioral responses with specific changes in intracellular signaling that may be promoted by THC and MDMA, we also measured the expression of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), as well as that of the activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc), both in the hippocampus and prefrontal cortex of these animals. ERK1/2 is believed to be modulated in the rat brain by chronic administration of THC [39] and MDMA [40], and these modifications have been related to changes in mood and anxiety-like behavior [41]. Similarly, Arc mRNA expression was modified by acute MDMA administration in the cortical and hippocampal regions of the rat [2], and this immediate early gene is translated to a cytosolic protein involved in synaptic plasticity, long-term potentiation and learning [42]. In addition, body weight was registered throughout the study, as were circulating levels of leptin and corticosterone, two hormones that respond to both cannabinoids [15,43] and MDMA [44,45]. Finally, prepro-orexin mRNA expression was analyzed in the hypothalamus since its expression is modulated by feeding [46] and these two drugs modify food intake.

Materials and methods

All the experiments performed here were approved by the Comité de Experimentación Animal (CEA) de la Universidad Complutense, and they were designed and performed in compliance with the Royal Decree 1201/2005, October 21, 2005 (BOE nº 252) regarding the protection of experimental animals and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Animals

Wistar albino rats of both sexes were used in this study. Experiments were carried out on the offspring of rats purchased from Harlan Laboratories (Milan, Italy), which were mated (one male x two females for ten consecutive days) in our animal facilities approximately 2 weeks after their arrival. After mating, female rats were housed individually and the animals were monitored daily for parturition. On the day of birth, postnatal day (pnd) 0, the litters were adjusted and sex balanced to eight pups per dam (four males and four females). At weaning (pnd 22), male and female rats were housed separately as pairs of sibling animals. A total of 128 male and female animals from 16 litters were used in the experiments. All the animals were maintained under constant conditions of temperature (22 ± 2 °C) and humidity (50 ± 2 %) on a reverse 12 h dark/light cycle (lights on at 20:00), with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; Safe, Augy, France) and water. It is worth mentioning that the stage of the estrous cycle was not examined in these studies. Given the length of the experimental protocol, we preferred not to perform periodic vaginal smears that would represent an additional source of stress to our animals and thus, might become a confounding factor in our study.

Drug treatments

Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC, commercialized as dronabinol) was purchased from THC Pharm GmbH (Frankfurt, Germany) and dispersed in ethanol, cremophor (Sigma-Aldrich, Spain) and saline (1:1:18) as described previously [15,47]. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) hydrochloride was purchased from Lipomed (Arlesheim, Switzerland) and solutions were prepared daily in saline (0.9% NaCl).

Drug treatments were administered only during adolescence, from pnd 28 to pnd 45 [48].

During this period, rats received intraperitoneal injections of increasing doses of THC (2.5 mg/kg from pnd 28 to 34; 5 mg/kg from pnd 35 to 40; 10 mg/kg from pnd 41 to 45) or of the vehicle alone, according to a protocol slightly modified from [34]. Additionally, every five

days, from pnd 30, the animals received two daily injections of MDMA (10 mg/kg, s.c., calculated as the salt) or saline (Sal), with an inter-dose interval of 4 h (at approximately 10.00 and 14.00). This follows a protocol modified from Meyer et al. (2008) where the authors reported similarities between the model and the effects of regular weekend ecstasy consumption [35]. Both drugs were administered at a volume of 2 ml/kg (see Fig. 1 for details).

Insert **FIGURE 1** around here

Body weight control

Body weight (BW) was registered daily during the administration period, from pnd 28 to 45, and every five days thereafter, from pnd 50 to 70. The evolution of BW was calculated as the difference in BW in relation to the reference value at pnd 30. Two periods were considered for statistical analyses: during drug administration, adolescence; and as young adults once drug administration was withdrawn (from pnd 50 to 70).

Body temperature measurements

Body temperature was measured by placing an electronic thermocouple rectal probe RTM-1 (Cibertec S.A., Madrid, Spain) in the rectum for 10 s. Rectal body temperature was measured on the first (pnd 30) and the last day (pnd 45) of MDMA (or Sal) administration. Body temperature was measured just before first MDMA (or Sal) injection, for baseline measures, and then, one and two hours later. Four hours later, immediately before the second MDMA (or saline) injection, body temperature was again registered, as well as one hour after.

Behavioral testing

Holeboard. On pnd 46, animals were placed in the testing room for a 30 min. habituation period. The holeboard consisted in a squared arena (60 cm x 60 cm x 45 cm) with matte-painted metallic walls, and a plastic-covered wooden floor divided into 36 equal squares (10

cm x 10 cm) and bearing four equally distant holes (3.8 cm in diameter). Animals were placed in the peripheral area of the arena for 5 min. under red light conditions and the animals' behavior was video recorded (Sony DCR-DVD310E) for subsequent evaluation. Rearing frequency (number of times that the animal stood on its rear limbs, vertical activity), and the frequency and duration of head-dipping exploration were recorded (RCV, Cibertec, Madrid, Spain). Locomotor activity in each region of the arena was measured by video tracking the animals (SMART version 2.5.20, Panlab, S.L.U, Barcelona, Spain) and the percentage of internal ambulation was calculated as an index of emotionality. Three animals accidentally fell out of the arena through one of the holes and were thus excluded from the analysis of the holeboard data. Nonetheless, these animals were submitted to the elevated plus maze in order to match the animals' conditions, although their behavior was not considered in the corresponding statistical analysis. The apparatus was carefully cleaned between tests on different animals with a 20% (v/v) ethanol solution.

Elevated plus-maze. The elevated plus-maze (EPM) is formed by two open arms (50 cm x 10 cm) and two equally sized enclosed arms with 40 cm high walls, arranged so that the arms of the same type are opposite one another. The junction of the four arms formed a central square area (10 cm x 10 cm). The apparatus was made of opaque black polyvinyl chloride (PVC) elevated to a height of 62 cm. On pnd 46, immediately after exposure to the holeboard, the animals were placed in the central platform of the apparatus facing one of the enclosed arms, and they were allowed to freely explore the maze for 5 min. under conditions of dim red light. Whenever an animal entered an arm with all four limbs, it was considered a visit, and the frequency and duration of the visits to the open and closed arm were recorded. Some animals fell from the plus-maze and were excluded from the analysis. Open arm entries and the time spent in the open arms was calculated as a percentage of the total entries into the arms and the total time spent in both arms, respectively, since these are considered the most relevant parameters related to anxiety in this test. By contrast, total arm entries were considered as an

index of general motor activity [36]. The apparatus was carefully cleaned between tests on different animals with a 20% (v/v) ethanol solution.

Novel object test. The novel object test (NOT) was performed in a square arena (60 cm x 60 cm x 45 cm) with matte-painted metallic walls and a plastic-covered wooden floor divided by white painted lines into 36 squares (10 cm x 10 cm). The test was performed as described previously by [37], with some minor modifications [16]. Animals were allowed to freely explore the arena for 5 min. under dim light conditions on 5 consecutive days (habituation period). On the first day of habituation (pnd 70), the arena was used as an open field and the animals' general activity was video recorded for subsequent behavioral evaluation (RCV, Cibertec, Madrid, Spain) and its locomotor activity was analyzed by video tracking (SMART, Panlab, S.L.U, Barcelona, Spain). Total ambulation and rearing frequency were registered, and the percentage of time spent in the internal area of the arena was calculated by dividing the time spent in the interior of the arena by the total duration of the test (5 min.), and then multiplying the resulting fraction by 100. On the test day (pnd 75), the rats were first exposed to two identical objects (two plastic boxes) until they explored the objects for 30 s or for a maximum period of 4 min., *training session*. Following a 4 h inter-trial interval, the rats were exposed to one of the previously encountered objects (familiar object, F1 or F2) and to a novel, unfamiliar object (metallic colored box, N) for 3 min., *test session*. The objects were not bigger than twice the size of a rat and they were located in contiguous corners, at a distance of 10 cm from the walls. At the beginning of each session, the animals were placed in the center of the apparatus facing the wall opposite to the objects. For each animal, the position of the objects was not changed between the training and the test session. However, the objects' position was changed between animals in order to avoid spatial preference. The apparatus and the objects were carefully cleaned between tests on different animals with a 20% (v/v) ethanol solution. Both training and test sessions were video recorded (Sony DCR-DVD310E) and the animals' behavior was later evaluated by an experienced observer by

means of event-recorder software (RCV, Cibertec, Madrid, Spain). The time spent exploring the objects during the two sessions was registered, whereby exploration of an object was considered whenever animals pointed their nose toward an object at a distance ≤ 1 cm, while turning around, climbing and/or biting the objects was not considered as exploration [16, 37]. In the test session, the discrimination index was calculated as the difference between the time spent exploring the novel object (N) and the familiar one (F1 or F2) in relation to the total time spent exploring the objects $[(N-F)/(N+F)]$. Negative discrimination index values were transformed to zero since we assumed that animals exploring the familiar object longer than the novel one were not able to discriminate between the objects. Animals that explored for less than 30 s during the training session and those exclusively exploring only one of the objects during the test session were excluded from the statistical analyses.

Prepulse Inhibition. The startle device consisted of a non-restrictive Plexiglas cage (28 cm x 16 cm x variable height) which encloses the sensor's platform but does not touch it. If the animal moves up or down, a transient force is developed on the platform and this transient force is measured at its peak, which represents the measure of the amplitude of the startle response. The rat's startle movements were transduced using an accelerometer and the data were monitored through a computer by using the MONRS v2.0 software (Cibertec S.A., Madrid, Spain). The startle response was recorded over 100 ms immediately following the pulse, with the startle device located in a constantly illuminated, sound-attenuating chamber (56 cm x 14 cm x 58 cm) and with a loudspeaker located in the top of the chamber.

On pnd 84, rats were placed in the startle chamber for a 5 min. habituation with 65 dB white background noise. The rats were then subjected to 10 startle trials (120 dB, 20 ms in duration), while for the prepulse inhibition (PPI) measurements animals were exposed to 10 blocks of five trials during which they were exposed to: 1) no startle stimulus (baseline activity, 65 dB); 2) the startle stimulus alone (120 dB, 20 ms. in duration); and 3) a startle stimulus occurring 100 ms. after the auditory prepulse (73, 75 or 80 dB, 20 ms. in duration).

The startle stimuli were presented at a variable inter-trial interval of 10 to 20 s, which occurred in a semi-random manner with the restriction that each trial type had to occur in every five trial blocks. The cage was cleaned with a 20% ethanol solution between tests on different animals. The amount of PPI is expressed as the relative decrease in the amplitude of the startle response caused by the presentation of a prepulse and it was calculated according to the formula: $100 \times [(\text{startle stimulus reactivity} - \text{startle stimulus reactivity in the presence of a prepulse}) / \text{startle stimulus reactivity}]$ [38]. Animals that responded less to the startle stimulus alone than to the no startle stimulus in more than one block during the test session were excluded from the analyses.

Plasma endocrine measurements

Blood samples were collected from the tail vein shortly after drug withdrawal, on pnd 50, into ice-cold EDTA capillary tubes (Microvette CB300, Sarsted, Granollers, Spain), and from the trunk at sacrifice (pnd 89-92), in vacuum blood collection EDTA tubes (Vacutest Plast, Lima, Arzergrande, Italy). The blood samples were centrifuged (3,000 rpm, 15 min. at 4°C), the plasma obtained and stored at -30 °C until hormones were measured.

Corticosterone was measured using a solid phase ^{125}I radioimmunoassay (ImmuchemTM Corticosterone kit, MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA) with a detection limit of 7.7 ng/ml, and intra-assay and inter-assay coefficients of variation less than 10%. Leptin was measured with an ELISA kit (B-Bridge International, Inc. Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The assay sensitivity for the leptin assay was 0.5 ng/ml, with an inter-assay variation 6.5% and intra-assay variation of 3.7%. Absorbance in each well was measured using a microplate reader (Tecan Infinite M200 (Grödig, Austria) and the plasma concentrations calculated from the standard curve. All samples were run in duplicate and plasma hormone concentrations were calculated from the standard curve.

Brain processing and analysis

At adulthood (pnd 89-92), animals were sacrificed by decapitation and their brain was rapidly extracted and dissected on ice. The frontal cortex, hippocampus and hypothalamus were obtained and stored at -80°C.

Immunoblotting of the frontal cortex and hippocampus. Protein samples were prepared as described previously [49] and they were analyzed in western blots probed with antibodies against ERK1/2 and phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204: Sigma, Madrid, Spain), against Arc (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA) and against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA). The blots were re-probed with GAPDH to ensure accurate protein loading. Optical densities of relevant immunoreactive bands were quantified after acquisition on a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) controlled by the Quantity One software version 4.6.3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The data were expressed as the relative change in optical density with respect to the male or female control group, considered as 100%. Since samples from male and female animals were analyzed in separate blots, sex-dependent effects could not be analyzed for these measurements.

Quantitative real-time PCR analysis of the hypothalamus. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen® GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions, and the quality of the total RNA was assessed through the spectrophotometric ratio A260/A280 (1.9 to 2.1), while the total RNA concentration was measured using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Reverse transcription was performed with 0.5 µg of total RNA from each animal to produce complementary DNA (cDNA) in a 20 µl reaction with 200 units of SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 500 ng oligo(dT)15 primers. The cDNA obtained was diluted 1:10 and stored at -20°C for later use. The reactions were carried out at 25°C for 10 min, then 50 min at 42°C and 15 min at 70°C.

Real-time PCR was carried out on a ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Paisley, UK) using the SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, Paisley, UK), according to the manufacturer's protocol. Briefly, 4 µl of the diluted cDNA template was amplified with SYBR Green in a 10 µl reaction containing 2x SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 µM of each primer and de-ionized water. The reactions were incubated at 50°C for 2 min to activate uracil N-glycosylase, and then for 10 min at 95°C to inactivate this enzyme and activate the Amplitaq Gold polymerase. Subsequently, the reaction was subjected to 40 amplification cycles with a 15 s denaturation at 95°C, 1 min. annealing at 60°C, a 15 s extension at 95°C and a final cooling step to 60°C. The quantities of specific mRNA in the sample were measured according to the corresponding gene-specific standard curve. All the samples were tested in triplicate and the relative expression values were normalized to the expression of GAPDH.

Primers specific for rat prepro-orexin (GenBank ID: NM_013179; sense, 5'-ACCACTGCACCGAAGATACCA-3'; antisense, 5'-GGGAAAGTTAGGACTAGGA-3') and rat GAPDH (NM_017008; sense, 5'-GCCAGCCTCGTCTCATAGACA-3'; antisense, 5'-GTCCGATACGGCCAAATCC-3') were used, and the amplified products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide to confirm the specificity of the primers. The quantities of specific mRNA in the sample were measured according to the corresponding gene-specific standard curve. All the samples were tested in triplicate and the relative expression values were normalized to the expression of GAPDH. Samples were analyzed by the double delta CT ($\Delta\Delta CT$) method and the $\Delta\Delta CT$ values were calculated as the ΔCT of each test sample (different pharmacological treatments) minus the mean ΔCT of the calibrator samples (male or female Vh-Sal – control – group) for the prepro-orexin gene. The fold change was calculated using the equation $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. Since the samples from male and female animals were assayed separately, sex-dependent effects could not be analyzed for this parameter.

Statistical analysis

Behavioral, physiological and endocrine data were analyzed by a three-way analysis of variance (ANOVA) with the factors sex (males *vs.* females), cannabinoid treatment (Vh *vs.* THC) and intermittent MDMA administration (Sal *vs.* MDMA). Due to the analytical limitations indicated above, the immunoblotting and PCR data were analyzed by two-way ANOVAs split by sex. Repeated measures ANOVAs were employed to analyze of the gain in body weight and temperature measurements. In the case of sphericity violation, a Greenhouse-Geisser correction was chosen to study the within-subjects factor effects. Additional two-way ANOVAs split by one of the independent factors (sex or pharmacological treatment) were performed to further clarify the results obtained. Normality and homocedasticity were assessed with Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. When necessary, the data were transformed to achieve a normal distribution and when a normal distribution could not be achieved by transforming the data, the Kruskal-Wallis non-parametric test was performed. The frequency of events (i.e. deaths and falls from the EPM) was analyzed with a chi-squared test. Post hoc comparisons using the Tukey test were performed with a level of significance set at $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out with the SPSS 19.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Body Weight gain

During drug treatment (adolescence) the rats gained significant body weight with age [$F(2.5, 277.9) = 4579.31$; $p < 0.001$]. Significant sex differences were observed [$F(1,110) = 276.55$; $p < 0.001$], with the body weight gain of males being higher than that of females, and there were significant effects of the two drugs employed, THC [$F(1,110) = 102.58$; $p < 0.001$] and MDMA [$F(1,110) = 98.78$; $p < 0.001$]. Moreover, a significant interaction between sex and

MDMA administration was also detected [$F(1,110) = 5.63$; $p < 0.05$]. Early during drug treatment (from pnd 31), animals administered MDMA showed a reduced rate in body weight gain that persisted until the last day of drug administration (pnd 45) in both males and females. In turn, THC administration during adolescence decreased the growth of male and female rats, although this effect was only evident from pnd 35 among males, while it was evident from pnd 31 in females. Both male and female adolescent animals treated with the combination of chronic THC and intermittent MDMA showed the lowest rate in body weight gain throughout the drug administration period (Fig. 2, left panels).

Following drug withdrawal, body weight gain still changed significantly with age [$F(2.4, 262.2) = 2889.1$; $p < 0.001$]. In addition, significant effects of sex [$F(1,110) = 1047.35$; $p < 0.001$] and the two drugs employed, THC [$F(1,110) = 41.60$; $p < 0.001$] and MDMA [$F(1,110) = 12.21$; $p < 0.01$], were still observed. Adolescent THC exposure induced a long-lasting reduction in body weight gain in male and female animals. However, this effect seemed to persist longer in males, an effect of THC on body weight gain was only observed in males at pnd 70 and not in females. Similarly, intermittent adolescent MDMA administration persistently reduced body weight in male animals (until pnd 65), whereas in females this drug seemed to decrease the gain in body weight only shortly after drug cessation (pnd 50), with this effect disappearing as these animals aged (Fig. 2, right panels).

Insert **FIGURE 2** around here

It is worth mentioning that five animals died during the present experiment, all of which received MDMA (two males and three females), and two of which were chronically administered with the vehicle alone, while three chronically received increasing doses of THC. The frequency analysis of the death rate between saline (no deaths) and MDMA administered animals (5 out of 64) was 7.8%, reflecting a significant effect of this drug ($\chi^2 = 5.20$, $p < 0.05$) in the absence of significant differences in the death rates depending upon

sex or cannabinoid administration. Since the animals' rearing conditions changed when the cage partner died, the surviving sibling animal housed in the same cage was also removed from the statistical analyses.

Body temperature measurement

The rats' body temperature was analyzed by comparing the changes from the first (pnd 30) and last (pnd 45) days of MDMA administration (Fig. 3). Rectal temperature was measured just before the first MDMA (or Sal) injection (baseline), and then one, two and four hours later, as well as immediately before the second MDMA (or Sal) injection and one hour later. On the two days of body temperature measurement, rectal temperature changed significantly over the time-points selected for the measures [pnd 30, $F(3.56, 391.25) = 125.43$; $p < 0.001$ and pnd 45, $F(3.29, 360.87) = 74.62$; $p < 0.001$ respectively]. On the first day of MDMA administration, a baseline body temperature of 37.5 ± 0.08 °C and 37.8 ± 0.08 °C was recorded in male and female animals, respectively. On pnd 30, a significant overall effect of MDMA on body temperature was observed [$F(1, 110) = 188.29$; $p < 0.001$], together with a significant THC x MDMA interaction [$F(1, 110) = 5.11$; $p < 0.05$]. Further analyses revealed that MDMA significantly increased body temperature (i.e.: it caused hyperthermia) in both male and female adolescent animals [$F(1, 56) = 101.28$; $p < 0.001$ and $F(1, 54) = 87.48$; $p < 0.001$], whereas the significant THC x MDMA interaction was only evident among female animals [$F(1, 54) = 4.63$; $p < 0.05$]. Thus, THC administration seemed to counterbalance the MDMA-induced hyperthermia exclusively among females (Fig. 3, upper panels). On pnd 45, significant overall effects of sex [$F(1, 110) = 8.13$; $p < 0.01$] and MDMA administration [$F(1, 110) = 169.82$; $p < 0.001$] were observed. Changes in body temperature were larger in males than females and MDMA administration induced a significant increase in body temperature (hyperthermia) on pnd 45, independently of the animal's sex, indicating no habituation to this hyperthermic effect (Fig. 3, lower panels).

Insert **FIGURE 3** around here

Behavioral testing

To facilitate the reading and comprehension of the behavioral results, the corresponding 3-way ANOVA data have been included in table 1

Insert **TABLE 1** around here

Holeboard. Neither of the drugs tested here produced significant effects on the overall locomotor activity, i.e.: total ambulation (Table 1). However, THC produced a significant effect on the percentage ambulation in the central region of the arena (Table 1), such that it decreased the distance traveled in the central zone (Table 2). By contrast, hole-directed explorative behavior was notably affected by MDMA administration, and both the frequency and time spent exploring the holes of the arena were significantly lower in animals that were administered this drug (see Table 1 and 2).

Insert **TABLE 2** around here

It is worth mentioning that the 3 animals that accidentally fell out of the arena through one of the holes came from different experimental groups: one male THC-MDMA, one female Vh-MDMA, and another female THC-Sal. Thus, this event seems not to be related to a specific drug treatment.

Elevated plus-maze. MDMA had a significant effect on the closed arm entries when analyzed with the Kruskal-Wallis test (Table 1). MDMA reduced the number of visits to the closed arms, indicating a decrease in general locomotor activity. No significant differences were found in the number of open arm entries, although the ANOVA of the percentage of

time spent in the open arms rendered a significant overall effect of sex and of MDMA. In order to confirm that this effect was independent from the reduced motor activity induced by the drug, we performed an additional analysis of the percentage of time spent in the open arms considering the closed arm entries as a covariate, confirming the effects of both factors [sex effect: $F(1,80) = 4.06$; $p < 0.05$; and MDMA effect: $F(1,80) = 4.99$; $p < 0.05$]. In summary, adolescent female rats explored the open arms of the maze for longer than the corresponding males, and MDMA administration increased the exploration time in the open-arms, independently of the MDMA-induced decrease in motor activity (Fig. 4).

Insert **FIGURE 4** around here

It is worth mentioning that MDMA-treated animals more often fell from the EPM than saline-treated animals ($\chi^2=10.53$, $p < 0.01$), with 19 out of 33 MDMA-treated animals falling from the EPM as opposed to 7 out of 56 saline treated animals. More specifically, the 26 animals that fell off the maze were distributed as follows: males: Vh-Sal (2), Vh-MDMA (5), THC-Sal (2), and THC-MDMA (4); females: Vh-Sal (2), Vh-MDMA (3), THC-Sal (1), and THC-MDMA (7).

Open field. In this test, a significant overall effect of sex was detected on total ambulation and frequency of rearing (Table 1), and as expected, females displayed greater motor activity than males (horizontal and vertical: see Table 3). In terms of the time spent exploring the interior of the arena, THC produced a significant overall effect, and there was a significant interaction between THC and MDMA (Table 1). THC administration decreased the time animals spent exploring the central region of the open field, indicative of increased emotionality/anxiety. MDMA induced a similar effect that was only evident in vehicle-treated animals [$F(1,56) = 4.20$; $p < 0.05$], and not in THC-treated animals, possibly due to the low

exploration of the internal zones of the arena exhibited by animals that had received THC (“floor effect”).

Insert **TABLE 3** around here

Novel Object Test. In the novel object test, an analysis of the discrimination index revealed a significant overall effect of sex, together with a significant interaction between sex and THC (Table 1). Additional analyses revealed that adolescent THC administration exclusively affected female animals [$F(1,50) = 9.08$; $p < 0.01$] and it did not modify this memory index in males. In addition, object exploration during the test session was significantly affected by the administration of MDMA, which decreased the time animals spent exploring both objects (see Table 1 and Fig. 5). As previously indicated, we excluded from the analyses any animals that explored the objects for less than 30 s in the training session, as well as those that only explored one of the objects in the test session. A total of 8 animals from the following experimental groups were disqualified based on these criteria: males from the Vh-Sal (1), Vh-MDMA (2), THC-Sal (1) and THC-MDMA (3) groups; females from the Vh-Sal (1), Vh-MDMA (1), THC-Sal (0) and THC-MDMA (2).

Insert **FIGURE 5** around here

Prepulse inhibition test. PPI responses to the three pre-pulse intensities were analyzed independently (Table 1) and for each pre-pulse intensity there was a significant overall effect of sex, suggesting that the sensorimotor gating was weaker in females than in males. A significant overall effect of MDMA was observed for 75 and 80 dB pre-pulse intensities and indeed, there was a significant interaction between THC and MDMA for the intermediate pre-pulse intensity (75 dB: Table 1). A more in depth analysis revealed that MDMA administration only reduced the percentage PPI response in animals that were also

administered THC [$F(1,52) = 8.63$; $p < 0.01$]. To summarize, adolescent MDMA administration significantly decreased the percentage of PPI at the highest pre-pulse intensity (80 dB), while following an intermediate pre-pulse stimulus (75 dB) this MDMA effect was only effective in reducing PPI response in combination with THC administration (Fig. 6). No significant effect of THC *per se* was found. Four animals (2 males Vh-MDMA and 2 females THC-MDMA) were excluded from this analysis since they responded less to the startle stimulus alone than to the no startle stimulus in more than one block during the test session.

Insert **FIGURE 6** around here

Hormone levels

Plasma corticosterone. When the corticosterone levels were analyzed by age, a marked sexual dimorphism for this endocrine parameter was evident at the two time points selected [pnd 50, $F(1,62) = 66.99$, $p < 0.001$; and around pnd 90, $F(1,62) = 62.11$, $p < 0.001$]. Plasma corticosterone levels were higher among females than males at both ages. While chronic THC administration during adolescence did not affect basal corticosterone levels in either sex, intermittent MDMA exposure significantly diminished long-term male corticosterone levels [$F(1,32) = 4.52$; $p < 0.05$] (Table 4).

Plasma leptin. Circulating leptin levels were also analyzed at two different time points, in adult (around pnd 90) and in younger rats (pnd 50). In adult animals, there were clear sex differences in plasma leptin levels [$F(1,53) = 25.56$, $p < 0.001$] in the absence of any drug-induced effect, with males showing higher leptin levels than the corresponding females. By contrast, no effects of sex were observed among the younger animals (pnd 50), although at this age the statistical analysis revealed a residual significant effect of chronic THC administration [$F(1,52) = 3.36$, $p = 0.073$]. Indeed, THC induced a significant decrease in leptin levels in females alone ($p = 0.05$; Table 4).

Insert **TABLE 4** around here

Protein expression in the frontal cortex and hippocampus

Activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc). Arc immunoreactivity was analyzed independently in male and female animals. While no significant differences in Arc expression were observed in the prefrontal cortex of male animals, THC administration produced a significant overall decrease in Arc protein in the prefrontal cortex of THC-treated females [$F(1,14) = 7.67$; $p < 0.05$]. Within the hippocampus, THC administration produced a significant overall decrease in Arc protein in both adult males [$F(1,14) = 7.81$; $p < 0.05$] and females [$F(1,14) = 46.38$; $p < 0.001$]. In addition, there was a significant overall effect of MDMA treatment [$F(1,14) = 5.31$; $p < 0.05$], as well as a significant interaction between THC and MDMA [$F(1,14) = 11.08$; $p < 0.01$]. Indeed, MDMA exposure exclusively reduced Arc immunoreactivity in THC-treated females [$F(1,7) = 13.51$; $p < 0.01$], with this drug producing no effect of this drug in animals administered MDMA and the vehicle for THC alone (Fig. 7, upper panels).

Phospho-ERK 1/2. Phospho ERK1/2 was also analyzed separately in male and female animals and there was a large significant overall reduction in phospho ERK1/2 in the prefrontal cortex of adult males following adolescent intermittent MDMA administration [$F(1,13) = 19.14$; $p < 0.01$] (Fig. 7, lower left panel). No changes in phospho ERK1/2 immunoreactivity were observed in the prefrontal cortex of females or in the hippocampus of either sex (Fig. 7, lower panels).

Insert **FIGURE 7** around here

Hypothalamic prepro-orexin mRNA expression

In separate two-way ANOVAs performed according to sex failed no significant difference in hypothalamic prepro-orexin mRNA expression was observed in female rats, while there was a significant THC and MDMA treatment interaction [$F(1,17)=5.07$; $p<0.05$] among males. THC administration decreased the amount of prepro-orexin mRNA in the hypothalamus of animals [$F(1,9)=12.17$; $p<0.01$], whereas such an effect was no longer evident in those rats that also received MDMA (Table 5).

Insert **TABLE 5** around here

Discussion

Cannabis and MDMA are among the most common illicit substances consumed by adolescents, yet the outcomes of the concurrent consumption of both substances remain unclear. Whereas a recent study reported behavioral effects of this combination in male rats [27], to the best of our knowledge this is the first study to analyze sexual dimorphisms directly and adopt a multidisciplinary assessment from molecular to behavioral, including an endocrine and metabolic analyses of the effects of combining these two drugs.

Body weight and temperature

In this study, THC administration during adolescence decreased the body weight gain in rats [15,34] and this effect appeared earlier in females than males. This effect may be related to the typical reduction of food intake observed after chronic cannabinoid administration [17], which might be secondary to the down-regulation of CB1 receptors observed in several brain regions, including the hypothalamus [50]. MDMA also reduced body weight gain during drug treatment, both in males and females, in agreement with previous studies [51]. MDMA treatment during adolescence has been shown to impair growth in rats [6] and mice [52],

probably due to the anorectic effects of the drug and to the water loss by evaporation resulting from enhanced respiration rates [35]. The rate of body weight gain was lowest in male and female adolescent animals treated with the combination of chronic THC and intermittent MDMA throughout the drug administration period, suggesting that the effect of these drugs may be additive. However, this possibility was not reported in a previous study performed on adolescent male rats [27]. In addition, significant long-term effects were still observed after drug cessation, although these long-term effects were sex dependent since they persisted longer in male rats which still displayed a decreased body weight gain on pnd 70 after THC treatment. Similarly, adolescent MDMA treatment persistently reduced body weight in male animals until pnd 65, whereas this treatment only decreased body weight gain over a shorter period (pnd 50) in females.

As expected, MDMA caused hyperthermia on the first day of injection in both male and female adolescent animals (pnd 30), consistent with previous studies performed on adult [53] and adolescent rats [27]. By contrast, THC administration alone did not modify body temperature. Although THC has been reported to induce hypothermia in rodents, the effects of cannabinoids on body temperature are quite variable and may depend on the dose used and the ambient temperature, among other factors [27,54]. Interestingly, THC attenuated MDMA-induced hyperthermia in females during the first day of injection. Indeed, concurrent administration of either THC or the synthetic cannabinoid agonist CP 55,940 has been seen to prevent MDMA-induced hyperthermia [26,27]. In the present study these interactions were further analyzed after chronic treatment. While MDMA-induced hyperthermia did not develop tolerance over days, THC only counteracted the hyperthermic effect of MDMA on the first day of injection. Therefore, this putative protective effect of THC on MDMA-induced hyperthermia may not be representative of current human habits of consumption, which would be more closely modeled by chronic studies. Moreover, species differences could be

important since THC did not attenuate MDMA-induced hyperthermia in humans but rather, it may even enhance it [55].

Behavioral outcomes

General activity in the holeboard was not modified by the different drug treatments. However, THC decreased the distance traveled in the interior of the arena, while hole-directed explorative behavior was modified by MDMA. In fact, both the frequency and the time spent exploring the holes were decreased by MDMA, in agreement with previous results [27]. These data suggest that one day after the pharmacological treatment both drugs increased emotionality or anxiety in this model. By contrast, MDMA administration increased the open-arm exploration in the EPM, which can be interpreted as an anxiolytic-like effect [36] or as an increase in risk-taking behavior [15,56]. The fact that MDMA-treated animals fell more often from the EPM suggests enhanced risk taking and impulsivity. Indeed, previous data suggests that intermittent adolescent MDMA exposure causes increased impulsivity in the EPM [27,35], consistent with the results obtained in ecstasy users [57,58]. Both, THC and MDMA given alone decreased the time spent exploring the central region of the open field, which further supports increased emotionality/anxiety and the possible enhancement of impulsivity in the EPM. Accordingly, adolescent MDMA administration in rats [51] and humans [59] may lead to increased anxiety in adulthood. Sex differences were revealed in these tests since adolescent female rats explored the open arms of the EPM for longer than males and they displayed greater motor activity in the open field, consistent with our previous findings [16]. In the NOT, THC administration during adolescence affected memory in adult female animals, suggesting an enhanced vulnerability of this sex to the long-term effects of THC on certain emotional and cognitive responses. Accordingly, chronic THC consumption by adolescent rats induces depressive-like behavior in adult female but not male rats [34]. The peripubertal period appears to be critical for the development of the endocannabinoid system and chronic cannabinoid exposure during this period may lead to persistent functional

impairment of the endocannabinoid system [19,20,28]. Indeed, chronic cannabinoid administration during the periadolescent period induces persistent memory impairment in adult rats [16,18]. Moreover, chronic THC administration produces a long-lasting impairment of the spatial working memory in adult rats [60], although this alteration may not be produced with lower doses of THC [61].

The greater sensitivity of female adolescents to the deleterious effects of cannabinoid exposure is evident in both humans and rodents [62]. These sex differences might be related to baseline sex differences in the density and activity of brain CB1 receptors. Indeed, female rats display higher CB1 receptor-mediated G protein activation in the hippocampal formation than males [16], probably to compensate for the lower density of CB1 receptors in this brain area in females [63]. Gonadal hormones inducing brain sexual differentiation during perinatal and periadolescent periods, particularly estradiol, seems to be critically involved in the sexually dimorphic effects of cannabinoids in adults (see [20] and [62] for review).

Pharmacokinetic factors may also be involved in these differences in response to cannabinoids since the cytochrome P450 responsible for cannabinoid metabolism appears to be sex-specific in rats, as witnessed by the preferential metabolism of THC to its highly active metabolite in females but not in males. In addition, THC is stored in fatty tissue that tends to be more prevalent in females than males, which may also influence the distribution and excretion of THC. These differences in metabolism may contribute to the more pronounced effects of THC in female rodents and humans [64].

The early adolescent period appears to be associated with a unique vulnerability to some of the adverse effects of cannabinoids. Thus, acute and chronic administration of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 induced more severe cognitive and social behavioral disturbances in pubertal than in adult rats [65]. These long-term cognitive effects of adolescent cannabinoid exposure seem to be related to impaired synaptic function in the hippocampus [60,63]. Indeed, early-onset cannabis users exhibit poorer cognitive

performance than late-onset users or control subjects [66]. Under the present experimental conditions, MDMA did not modify long-term cognitive responses in the NOT, in agreement with previous studies [51]. However, MDMA may be detrimental to cognition in other paradigms of working memory in rats [67], as well as to working memory [68] and associative learning [69] in current and abstinent human users. It has been suggested that a critical period may exist between pnd 11-20 for the long-term effects of MDMA on cognition [70]. The results presented here also indicate that general object exploration during the test session was impaired by MDMA treatment, which may suggest a poorer attention capability, consistent with the results obtained in the PPI test.

Prepulse inhibition of the acoustic startle response has been widely used as a measure of sensorimotor gating and deficient PPI has been reported in several neuropsychiatric disorders [38]. Drugs that release serotonin, such as MDMA, acutely impair sensorimotor gating [71] in a dose-dependent manner in both sexes [32], although no effect of MDMA was reported after repeated intermittent administration [72]. The present results show that adolescent MDMA administration decreased PPI performance in adulthood. Therefore, adolescent animals seem to be particularly vulnerable to the effects of MDMA on PPI considering the negative results obtained with this administration schedule in adult rats [72], although different experimental conditions were used in these two studies. THC did not modify PPI in our experimental conditions, in contrast to previous reports showing PPI impairment in adult females after adolescent treatment with CP 55,940 [15], as well as in males after peripubertal exposure to WIN55,212-2 [17,73]. Thus, the doses of THC used here may not have been sufficiently high to impair PPI. At a prepulse intensity of 75dB, MDMA was only effective in reducing PPI when combined with THC treatment, suggesting that THC may enhance the effects of MDMA and that the combination of both drugs may increase the possibility of developing psychiatric symptoms. An impaired PPI is observed in patients suffering from psychotic symptoms and personality traits that may enhance drug consumption [74]. Therefore,

adolescent MDMA exposure may increase vulnerability to develop psychiatric disorders and facilitate the co-abuse of other drugs.

Hormone levels

In agreement with previous studies using cannabinoid agonists [15,17], chronic THC administration during adolescence did not affect basal corticosterone levels in either sex. By contrast, adolescent intermittent MDMA exposure induced a long-term decrease in corticosterone levels in male rats. Previous studies reported that acute MDMA treatment produced a short-term dose-dependent increase in corticosterone levels [75], and this effect produced partial tolerance after two weeks of intermittent treatment [76]. A different protocol of daily THC administration and intermittent MDMA treatment every fifth day from postnatal day 35 to 60 did not provoke any effect on basal corticosterone levels or the corticosterone stress response [27]. These differences with the results of the present study might be due to the different experimental conditions. By contrast, elevated baseline cortisol and ACTH levels were revealed in experienced human ecstasy users compared to non-using controls [77], suggesting species differences in neuroendocrine reactivity to MDMA. As for the majority of the parameters studied, corticosterone levels showed a marked sexual dimorphism among control animals, with higher circulating hormone levels in females than in males during adolescence and adulthood, consistent with previous data from adult [17] and adolescent [47] rats.

Circulating leptin levels were not significantly modified by THC or MDMA, although adolescent THC administration tended to decrease leptin levels in female animals consistent with the reduced leptin levels revealed in males after chronic adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP 55,940 [15]. These results suggest that exposure to cannabinoids during the periadolescent period may reduce circulating leptin levels, although the extent of this effect may depend on the specific cannabinoid agonist, dose and administration schedule used.

Previous studies suggested that acute MDMA administration induced a transient dose-dependent effect on serum leptin levels [45], and this may explain the absence of changes in leptin levels after a long wash-out period. Sex differences were also revealed among adult control animals, with males showing higher leptin levels than the corresponding females, although no sex differences were observed in young animals, in accordance with previous studies showing higher plasma leptin levels in males than in females only after puberty [78].

Neurochemical changes

Several neurochemical responses were evaluated to identify possible neurobiological mechanisms related to the behavioral changes induced in adult animals by chronic exposure to THC and/or MDMA. Arc immunoreactivity was first investigated, which is protein rapidly modulated in a synaptic activity-dependent manner [79,80]. In the prefrontal cortex, no significant differences in Arc were observed in male animals, while a decrease was evident in THC-treated females. In the hippocampus, adolescent THC administration decreased the accumulation of Arc protein in adult males and females. In addition, an interaction between both drugs was found in this brain structure since MDMA exclusively reduced Arc immunoreactivity in THC-treated females. Interestingly, local down-regulation of Arc protein in the hippocampus using antisense oligodeoxynucleotides selectively impairs the consolidation of spatial learning [81], pointing to a possible relationship between the memory deficits found in the female rats administered THC and MDMA, and the decrease in Arc expression.

We also investigated phospho-ERK 1/2 immunoreactivity, which has been reported elsewhere to be modulated by THC [39] and MDMA [40]. Changes in ERK1/2 phosphorylation have been associated with mood changes in animal models [41] and in our experimental setting, ERK1/2 signaling was down-regulated in the frontal cortex of adult male rats exposed to MDMA during the adolescence, although no significant effects were observed in females. In MDMA treated males, ERK 1/2 changes may be related to the behavioral alterations found

immediately after the end of the pharmacological treatment in the holeboard test (i.e.: a decrease in the frequency and time spent head-dipping, indicative of increased emotionality) and in the EPM, where they showed increased risk taking behavior. However, MDMA females showed similar short-term behavioral alterations in the holeboard test and in the EPM but no changes in their ERK1/2 expression at adulthood. It is known that estradiol exerts some of its neuroprotective effects by activating ERK signaling [82]. It is tempting to speculate that in females, this gonadal hormone restores this signaling system during the wash-out period between the pharmacological treatments administered here and the sample collection. In our hands, THC did not induce any significant effect on ERK1/2 signaling despite the fact that immediately after acute and chronic treatment with THC, an increase in phospho-ERK immunoreactivity has been described in different brain areas [39]. However, in our protocol the THC treatment ended long before the biochemical assays were performed and therefore, it is likely that ERK1/2 signaling has been totally restored by then. In other words, the failure to detect a correlation in the present study may be due to the time that past between the behavioral and biochemical evaluations.

Lastly, THC induced a specific decrease in hypothalamic prepro-orexin expression in male animals. Given that CB1R axonal immunoreactivity has been reported in the medial hypothalamus [83], the action of THC on hypothalamic CB1 receptors may have induced the down-regulation in preproorexin. Indeed, a recent study has demonstrated that CB1 receptor agonists modulate the activity of orexin/hypocretin neurons, probably by interacting with presynaptic CB1 receptors located on GABA terminals [84]. Moreover, the specific down-regulation of hypothalamic prepro-orexin found in adult males exposed to THC alone was prevented when these rats received both THC and MDMA during adolescence. Interestingly, repeated administration of another psychostimulant, cocaine, induces long-lasting potentiation of glutamatergic synapses on orexin neurons in mice [85]. A similar excitatory mechanism could explain the blockade of the effects induced by THC treatment on orexin expression

when combined with intermittent MDMA treatment. No effects were found in females for prepro-orexin mRNA levels, which again suggests a neuroprotective mechanism of hypothalamic orexin neurons against THC-related impairments in these mice, probably in connection with sexual steroids.

Conclusions

It has been suggested that acute THC and MDMA administration may have opposing effects on animals, although their negative effects might be additive when taken chronically [22]. The animal model used in this study mimics the current habits of human adolescent consumption and thus, it may provide a more reliable picture of the detrimental consequences of polydrug abuse than acute experiments, particularly regarding THC and MDMA that are frequently co-abused among adolescents. Whereas there may be some apparent balancing of the detrimental effects of one of the two drugs during an initial exposure, such as in terms of body temperature, the opposite seem to occur in the long-term after repeated exposure, as seen here for body weight and the PPI response. The reported behavioral effects of THC and/or MDMA are possibly related to alterations in neurotransmitter systems that have already been shown to be altered after consumption of these drugs. For instance, a depletion of serotonergic nerve terminals in diverse brain regions may be produced by MDMA administration and this may underlie the increase in emotionality and risk-taking behavior, as well as the weight loss, reported immediately after drug cessation. In turn, the persistent changes in the endocannabinoid system induced by chronic THC administration may be related to deficits in working memory evident in female animals, and/or with the impairments to PPI responses. Further studies will be required to unravel the molecular mechanisms underlying the long-term behavioral effects of both drugs.

Despite the experimental limitations, such as the application of only one schedule of drug administration, the use of only one dose of MDMA and increasing doses of THC, the

selection of this animal model to mimic the current habits of human adolescent consumption opens new avenues for translational research in the field of drug consumption. In addition, the study of endocrine and neurochemical data in the same animal at different time points allows us to establish potential associations, although more additional experiments will be necessary to obtain evidence for causal relationships. The data presented revealed diverse sexual dimorphisms that are probably due to the organizational effects of perinatal gonadal hormones during a critical period of brain sexual differentiation [86], and/or to their organizational effects and the activation they produce during the periadolescent period [20,28]. A better understanding of the mechanisms underlying the sexually dimorphic effects of cannabinoids [20,28] and MDMA [87] will facilitate the development of sex-specific preventive and therapeutic strategies.

Acknowledgements: This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud (ISCIII y FEDER): Red de trastornos adictivos RD06/0001/1013, RD2012/0028/0021 and RD06/001/001; GRUPOS UCM-BSCH (GRUPO UCM 951579); Plan Nacional sobre Drogas en la convocatoria de Orden SAS/1250/2009. ALB held a FPU predoctoral grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interests to declare.

References

- [1] Cunningham JI, Raudensky J, Tonkiss J, Yamamoto BK (2009) MDMA pretreatment leads to mild chronic unpredictable stress-induced impairments in spatial learning. *Behav Neurosci* 123: 1076-1084.
- [2] Beveridge TJ, Mehan AO, Sprakes M, Pei Q, Zetterstrom TS, et al. (2004) Effect of 5-HT depletion by MDMA on hyperthermia and Arc mRNA induction in rat brain. *Psychopharmacology (Berl.)* 173: 346-352.
- [3] Parrott AC (2004) MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) or ecstasy: the neuropsychobiological implications of taking it at dances and raves. *Neuropsychobiology* 50: 329-335.
- [4] Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2009) Neurotoxicity of drugs of abuse--the case of methylenedioxyamphetamines (MDMA, ecstasy), and amphetamines. *Dialogues Clin Neurosci* 11: 305-317.
- [5] Ludwig V, Mihov Y, Schwarting RK (2008) Behavioral and neurochemical consequences of multiple MDMA administrations in the rat: role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 189: 52-64.
- [6] Piper BJ (2007) A developmental comparison of the neurobehavioral effects of ecstasy (MDMA). *Neurotoxicol Teratol* 29: 288-300.
- [7] Walker QD, Williams CN, Jotwani RP, Waller ST, Francis R, et al. (2007) Sex differences in the neurochemical and functional effects of MDMA in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 189: 435-445.
- [8] Quednow BB, Kühn KU, Hoppe C, Westheide J, Maier W, et al. (2007) Elevated impulsivity and impaired decision-making cognition in heavy users of MDMA ("Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl.)* 189: 517-530.

- [9] Quednow BB, Jessen F, Kuhn KU, Maier W, Daum I, et al. (2006) Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *J Psychopharmacol* 20: 373-384.
- [10] EMCDDA (2011) Annual report 2011: the state of the drug problem in Europe. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- [11] Robledo P (2010) Cannabinoids, opioids and MDMA: neuropsychological interactions related to addiction. *Curr Drug Targets* 11: 429-439.
- [12] Senn Ch, Bücheli A, Schaub M, Stohler R (2007) Club drugs. *Ther Umsch* 64: 109-113.
- [13] Malone DT, Hill MN, Rubino T (2010) Adolescent cannabis use and psychosis: epidemiology and neurodevelopmental models. *Br J Pharmacol* 160:511-522.
- [14] Rubino T, Parolaro D (2008) Long lasting consequences of cannabis exposure in adolescence. *Mol Cell Endocrinol* 286: S108-S113.
- [15] Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, López-Gallardo M, Armario A, et al. (2011) Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16: 624-637.
- [16] Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, et al. (2011) Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB(1) cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol* 25: 1676-1690.
- [17] Biscaia M, Marín S, Fernández B, Marco EM, Rubio M, et al. (2003) Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl.)* 170: 301-308.
- [18] Schneider M, Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1760-1769.

- [19] Rodríguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnín A, Fernández-Ruiz JJ (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4: 135-138.
- [20] Viveros MP, Llorente R, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, et al. (2012) The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol* 26: 164-176.
- [21] Schulz S (2011) MDMA & cannabis: a mini-review of cognitive, behavioral, and neurobiological effects of co-consumption. *Curr Drug Abuse Rev* 4: 81-86.
- [22] Parrott AC, Milani RM, Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2007) Cannabis and Ecstasy/MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): an analysis of their neuropsychobiological interactions in recreational users. *J Neural Transm* 114: 959-968.
- [23] Wish ED, Fitzelle DB, O'Grady KE, Hsu MH, Arria AM (2006) Evidence for significant polydrug use among ecstasy-using college students. *J Am Coll Health* 55: 99-104.
- [24] Robledo P, Trigo JM, Panayi F, de la Torre R, Maldonado R (2007) Behavioural and neurochemical effects of combined MDMA and THC administration in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 195: 255-264.
- [25] Young JM, McGregor IS, Mallet PE (2005) Co-administration of THC and MDMA ('ecstasy') synergistically disrupts memory in rats. *Neuropsychopharmacology* 30: 1475-1482.
- [26] Morley KC, Li KM, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS (2004) Cannabinoids prevent the acute hyperthermia and partially protect against the 5-HT depleting effects of MDMA ('Ecstasy') in rats. *Neuropharmacology* 46: 954-965.
- [27] Shen EY, Ali SF, Meyer JS (2011) Chronic administration of THC prevents the behavioral effects of intermittent adolescent MDMA administration and attenuates MDMA-induced hyperthermia and neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 61: 1183-1192.

- [28] Viveros MP, Marco EM, López-Gallardo M, Garcia-Segura LM, Wagner EJ (2011) Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1740-1751.
- [29] Viveros MP, Llorente R, López-Gallardo M, Suarez J, Bermúdez-Silva F, et al. (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S217-S226.
- [30] Viveros MP, Marco EM, File SE (2006) Nicotine and cannabinoids: parallels, contrasts and interactions. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 1161-1181.
- [31] Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP (2004) Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends Pharmacol Sci* 25: 273-279.
- [32] Bubeníková V, Votava M, Horáček J, Páleníček T (2005) Relation of sex and estrous phase to deficits in prepulse inhibition of the startle response induced by ecstasy (MDMA). *Behav Pharmacol* 16: 127-130.
- [33] Palenicek T, Votava M, Bubenikova V, Horacek J (2005) Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol Behav* 86: 546-553.
- [34] Rubino T, Vigano D, Realini N, Guidali C, Braida D, et al. (2008) Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33: 2760-2771.
- [35] Meyer JS, Piper BJ, Vancollie VE (2008) Development and characterization of a novel animal model of intermittent MDMA ("Ecstasy") exposure during adolescence. *Ann NY Acad Sci* 1139: 151-163.
- [36] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-167.

- [37] Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47-59.
- [38] Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl.)* 156: 117-154.
- [39] Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D (2004) Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol Cell Neurosci* 25: 355-362.
- [40] Di Benedetto M, Bastías Candia Sdel C, D'Addario C, Porticella EE, Cavina C, et al. (2011) Regulation of opioid gene expression in the rat brainstem by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): role of serotonin and involvement of CREB and ERK cascade. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 383: 169-178.
- [41] Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, et al. (2003) The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 23: 7311-7316.
- [42] Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, et al. (2010) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200: 125-140.
- [43] Hill MN, Tasker JG (2012) Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204: 5-16.
- [44] Graham DL, Herring NR, Schaefer TL, Vorhees CV, Williams MT (2010) Glucose and corticosterone changes in developing and adult rats following exposure to (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine or 5-methoxydiisopropyltryptamine. *Neurotoxicol Teratol* 32: 152-157.
- [45] Kobeissy FH, Jeung JA, Warren MW, Geier JE, Gold MS (2008) Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addict Biol* 13: 15-25.

- [46] Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, et al. (1999) Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48: 2132-2137.
- [47] Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, et al. (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 636-650.
- [48] Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 417-463.
- [49] Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R (2007) Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 102: 1105-1114.
- [50] Sim-Selley LJ (2003) Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev Neurobiol* 15: 91–119.
- [51] Kolyaduke OV, Hughes RN (2012) Increased anxiety-related behavior in male and female adult rats following early and late adolescent exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Pharmacol Biochem Behav* 103: 742-749.
- [52] Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y (2003) Methylphenidate and MDMA exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* 45: 106–115.
- [53] Malberg JE, Seiden LS (1998) Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci* 18: 5086-5094.
- [54] Taffe MA (2012) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol attenuates MDMA-induced hyperthermia in rhesus monkeys. *Neuroscience* 201: 125-133.

- [55] Dumont GJ, Kramers C, Sweep FC, Touw DJ, van Hasselt JG, et al. (2009) Cannabis coadministration potentiates the effects of “ecstasy” on heart rate and temperature in humans. *Clin Pharmacol Ther* 86: 160–166.
- [56] Davis JF, Krause EG, Melhorn SJ, Sakai RR, Benoit SC (2009) Dominant rats are natural risk takers and display increased motivation for food reward. *Neuroscience* 162: 23–30.
- [57] Montoya AG, Sorrentino R, Lukas SE, Price BH (2002) Long-term neuropsychiatric consequences of “ecstasy” (MDMA): a review. *Harv Rev Psychiatry* 10: 212–220.
- [58] Morgan MJ (2000) Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology (Berl.)* 152: 230–248.
- [59] Lieb R, Schuetz CG, Pfister H, von Sydow K, Wittchen H (2002) Mental disorders in ecstasy users: a prospective-longitudinal investigation. *Drug Alcohol Depend* 68: 195–207.
- [60] Rubino T, Realini N, Braidà D, Guidi S, Capurro V, et al. (2009) Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19: 763–772.
- [61] Cha YM, Jones KH, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (2007) Sex differences in the effects of D9 tetrahydrocannabinol on spatial learning in adolescent and adult rats. *Behav Pharmacol* 18: 563–569.
- [62] Craft RM, Marusich JA, Wiley JL (2012) Sex differences in cannabinoid pharmacology: A reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life Sci* 92: 476–481.
- [63] López-Gallardo M, López-Rodríguez AB, Llorente-Berzal A, Rotllant D, Mackie K, et al. (2012) Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience* 204: 90–103.

- [64] Anderson BM, Rizzo M, Block RI, Pearlson GD, O'Leary DS (2010) Sex, drugs, and cognition: effects of marijuana. *J Psychoactive Drugs* 42: 413-424.
- [65] Schneider M, Schömig E, Leweke FM (2008) Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13: 345–357.
- [66] Pope HG Jr, Gruber AJ, Hudson JI, Cohane G, Huestis MA, et al. (2003) Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? *Drug Alcohol Depend* 69:303–310.
- [67] Rodsiri R, Spicer C, Green AR, Marsden CA, Fone KC (2011) Acute concomitant effects of MDMA binge dosing on extracellular 5-HT, locomotion and body temperature and the long-term effect on novel object discrimination in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 213: 365–376.
- [68] Parrott AC, Lees A, Garnham NJ, Jones M, Wesnes K (1998) Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. *J Psychopharmacol* 12: 79–83.
- [69] Montgomery C, Fisk JE, Newcombe R (2005) The nature of ecstasy-group related deficits in associative learning. *Psychopharmacology (Berl.)* 180: 141–149.
- [70] Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV (2008) Developmental effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a review. *Behav Pharmacol* 19: 91-111.
- [71] Vollenweider FX, Remensberger S, Hell D, Geyer MA (1999) Opposite effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on sensorimotor gating in rats versus healthy humans. *Psychopharmacology (Berl.)* 143: 365–372.
- [72] Shortall SE, Macerola AE, Swaby RT, Jayson R, Korsah C, et al. (2012) Behavioural and neurochemical comparison of chronic intermittent cathinone, mephedrone and MDMA administration to the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* In Press

- [73] Wegener N, Koch M (2009) Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res* 1253: 81–91.
- [74] Sher KJ, Bartholow BD, Wood MD (2000) Personality and substance use disorders: a prospective study. *J Consult Clin Psychol* 68: 818–829.
- [75] Nash JF Jr, Meltzer HY, Gudelsky GA (1988) Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 873-879.
- [76] Baumann MH, Wang X, Rothman RB (2007) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology (Berl.)* 189: 407-424.
- [77] Gerra G, Bassignana S, Zaimovic A, Moi G, Bussandri M, et al. (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in subjects with 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ('ecstasy') use history: correlation with dopamine receptor sensitivity. *Psychiatry Res* 120: 115-124.
- [78] Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, et al. (2011) Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J Neuroendocrinol* 23: 329-344.
- [79] Korb E, Finkbeiner S (2011) Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* 34: 591-598.
- [80] Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28: 11760-11767.
- [81] Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, et al. (2000) Inhibition of activity-dependent *arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20: 3993-4001.

- [82] Lebesgue D, Chevaleyre V, Zukin RS, Etgen AM (2009) Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74: 555-561.
- [83] Wittmann G, Deli L, Kallo I, Hrabovszky E, Watanabe M, et al. (2007) Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 503:270–279.
- [84] Acuna-Goycolea C, Obrietan K, van den Pol AN (2010). Cannabinoids excite circadian clock neurons. *J Neurosci.* 30: 10061-10066.
- [85] Rao Y, Mineur YS, Gan G, Wang AH, Liu ZW, et al. (2013) Repeated in vivo exposure of cocaine induces long-lasting synaptic plasticity in hypocretin/orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus in mice. *J Physiol* 591: 1951-1966.
- [86] McLusky NJ, Naftolin F (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294–1303.
- [87] Allott K, Redman J (2007) Are there sex differences associated with the effects of ecstasy/3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)? *Neurosci Biobehav Rev* 31: 327-347.

Figure legends

FIGURE 1 - Timeline of the experimental design. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle, i.p.) from pnd 28 to 45, and to MDMA (10 mg/kg or saline, s.c.) twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 with an inter-dose interval of 4 h (n= 16 animals per experimental group, see text for details). One day after the last drug administration, on pnd 46, the holeboard test (HB) was performed, immediately followed by the elevated plus maze test (EPM). The novel object test (NOT) was performed on pnd 75, and open-field (OF) data obtained from the first day of habituation to the arena on pnd 71 was also used. The animals were submitted to the prepulse inhibition test (PPI) on pnd 84. Thereafter, around pnd 90 (pnd 89 - 92), the animals were sacrificed and their brain was collected for future analyses. In addition, blood samples were extracted from the tail vein on pnd 50 for endocrine measurements, and from the trunk at sacrifice.

FIGURE 2 - Evolution of body weight gain during the drug administration period (left panels) and following drug withdrawal (right panels). The animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45, and to MDMA (10 mg/kg or saline) twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). Body weight was registered daily during the administration period, from pnd 28 to 45, and every five days from pnd 50 to 70 (arrows indicate MDMA/Sal injections). The gain in body weight (in grams, g; mean \pm S.E.M.) is expressed as the difference in body weight in males (upper panels) and females (lower panels) on each experimental day, and pnd 30 was established as the reference day. Number of animals per experimental group: males, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-Sal (16), THC-MDMA (14); and females, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-Sal (16), THC-MDMA (12). According to a repeated measures ANOVA ($P < 0.05$): (e) significant overall effect of THC within the same sex group; (g) significant MDMA effect within the same sex group.

FIGURE 3 - Changes in body temperature on the first (pnd 30) and last (pnd 45) days of MDMA administration. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45 and to MDMA (10 mg/kg or saline) twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). The animals' body temperature was measured just before the first MDMA (or Sal) injection to establish the baseline, and then one, two and four hours later, the latter immediately before the second MDMA (or Sal) injection, as well as one hour after that second injection (arrows indicate MDMA/Sal injections). The figures show the change in rectal temperature with respect to the baseline temperature (mean \pm S.E.M.) expressed in degrees centigrade ($^{\circ}$ C). The number of animals per experimental group: males, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-Sal (16), THC-MDMA (14); and females, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-Sal (16), THC-MDMA (12). According to a repeated measures ANOVA ($P < 0.05$), (g) represents a significant MDMA effect within the same sex group.

FIGURE 4 - The elevated plus maze test was performed one day after the last drug administration, on pnd 46, immediately after the holeboard test. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45, and twice daily to MDMA (10 mg/kg or saline) every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). Histograms (mean \pm S.E.M.) show the percentage time spent in the open arms (right panel) and the frequency of the closed arm entries (left panel). Number of animals per experimental group: males, Vh-Sal (14), Vh-MDMA (9), THC-Sal (14), THC-MDMA (9); and females, Vh-Sal (14), Vh-MDMA (10), THC-Sal (14), THC-MDMA (5). According to the Kruskal-Wallis test and ANOVA ($P < 0.05$): (a) significant overall effect of sex; (c) significant overall effect of MDMA treatment.

FIGURE 5 – The novel object test (NOT) was performed on pnd 75. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45 and to MDMA (10 mg/kg or saline) twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). The histograms (mean \pm S.E.M.) show the discrimination index (left panel) measured as the difference between the time spent exploring the novel object (N) and the time spent exploring the familiar one (F1 or F2) in function of the total time spent exploring the two objects during the test session $[N - F/(N + F)]$. The time animals spent exploring both objects during the test session is also shown (right panel). Number of animals per experimental group: males, Vh-Sal (15), Vh-MDMA (12), THC-Sal (15), THC-MDMA (11); and females, Vh-Sal (15), Vh-MDMA (13), THC-Sal (16), THC-MDMA (10). According to ANOVA ($P < 0.05$): (a) significant overall effect of sex; (c) significant overall effect of MDMA treatment; (e) significant overall effect of THC within the same sex group.

FIGURE 6 – The prepulse inhibition test (PPI) was performed at adulthood, on pnd 84. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45 and to MDMA (10 mg/kg or saline) twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). The histograms represent the percentage of PPI (mean \pm S.E.M.) with three different pre-pulse intensities (73, 75 and 80 dB). Number of animals per experimental group: males, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (12), THC-Sal (16), THC-MDMA (14); and females, Vh-Sal (16), Vh-MDMA (14), THC-Sal (16), THC-MDMA (10). According to ANOVA ($P < 0.05$): (a) significant overall effect of sex; (c) significant overall effect of MDMA treatment; (f) significant MDMA effect among THC-treated animals.

FIGURE 7 – Accumulation of activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc, upper panels) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (phosphor-ERK1/2, lower panels) in the frontal cortex (left panels) and hippocampus (right panels) of adult animals

sacrificed around pnd 90. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg) or vehicle from pnd 28 to 45, and to MDMA (10 mg/kg) or saline twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). The histograms (mean \pm S.E.M.) show the relative change in optical density with respect to the male or female control group. Number of animals per experimental group (n=4-5). According to ANOVA ($P < 0.05$): (e) significant overall effect of THC within the same sex group; (f) significant MDMA effect among THC-treated animals; (g) significant MDMA effect within the same sex group.

Tables

Table 1. Main results from the statistical analysis of behavioral data.

Behav. test	Parameter analyzed	Statistics	Sex	THC	MDMA	Sex x THC	Sex x MDMA	THC x MDMA	Sex x THC x MDMA
HB	Total ambulation	F _(1,107) p-value	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	% internal ambulation	F _(1,107) p-value	- -	4.35 <0.05	- -	- -	- -	- -	- -
	Head-dipping frequency	F _(1,107) p-value	- -	- -	7.64 <0.01	- -	- -	- -	- -
	Head-dipping duration	F _(1,107) p-value	- -	- -	8.50 <0.01	- -	- -	- -	- -
	Closed arm entries	H ₍₁₎ p-value	- -	- -	4.97 <0.05	- -	- -	- -	- -
EPM	% open arm entries	F _(1,81) p-value	4.29 <0.05	- -	8.50 <0.01	- -	- -	- -	- -
	% time in open arms	F _(1,81) p-value	4.32 <0.05	- -	- -	- -	8.21 <0.01	- -	- -
	Total ambulation	F _(1,110) p-value	64.64 <0.001	- -	- -	- -	- -	- -	- -
OF	Rearing frequency	F _(1,110) p-value	48.72 <0.001	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	Internal time	F _(1,110) p-value	- -	4.54 <0.05	- -	- -	4.74 <0.05	- -	- -
	Discrimination index	F _(1,99) p-value	5.84 <0.05	- -	- -	5.86 <0.05	- -	- -	- -
NOT	Object exploration	F _(1,99) p-value	- -	- -	6.46 <0.05	- -	- -	- -	- -
	% PPI 73 dB	F _(1,106)	4.23	-	-	-	-	-	-

	p-value	<0.05	-	-	-	-	-	-
% PPI 75 dB	F _(1,106)	8.98	-	5.32	-	-	4.24	-
	p-value	<0.01	-	<0.05	-	-	<0.05	-
% PPI 80 dB	F _(1,106)	8.89	-	4.57	-	-	-	-
	p-value	<0.01	-	<0.05	-	-	-	-

Behavioral tests were carried out on animals that had been exposed in the adolescent period to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45 and to MDMA (10 mg/kg or saline) twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). Three-way ANOVA analyses were performed, except for on the closed arm entries, with factors being sex (males *vs.* females), neonatal manipulation (control *vs.* MD) and drug treatment (Sal *vs.* Coc). The main statistical values are shown: F, with degrees of freedom, or H (in the case of Kruskal-Wallis) for closed arm entries, and p-values. Non-significant results are not included (-). Behavioral tests: HB, holeboard test; EPM, elevated plus maze; OF, open field; NOT, novel object test; PPI, prepulse inhibition test.

TABLE 2. Locomotor activity and exploration in the holeboard test

		Total ambulation	Internal	Head-dipping	Head-dipping
		(m)	ambulation (%)	(frequency)	(duration, s)
Males	Vh-Sal (16)	23.85 ± 1.31	19.4 ± 2.6	16.8 ± 1.7	29.4 ± 3.4
	Vh-MDMA (14)	21.11 ± 1.45	16.7 ± 1.9	13.0 ± 1.4 ^c	23.5 ± 3.0 ^c
	THC-Sal (16)	22.73 ± 1.21	15.2 ± 2.2 ^b	16.3 ± 1.1	33.1 ± 2.7
	THC-MDMA (13)	23.43 ± 1.06	14.9 ± 1.1 ^b	14.2 ± 1.4 ^c	27.9 ± 3.4 ^c
Females	Vh-Sal (16)	25.95 ± 1.23	15.7 ± 1.6	17.6 ± 1.3	34.2 ± 3.2
	Vh-MDMA (13)	24.21 ± 1.06	18.4 ± 1.4	14.6 ± 1.3 ^c	26.4 ± 3.3 ^c
	THC-Sal (15)	23.38 ± 0.79	16.0 ± 1.3 ^b	17.3 ± 1.6	38.1 ± 3.4
	THC-MDMA (12)	22.68 ± 1.86	13.8 ± 2.6 ^b	14.3 ± 2.2 ^c	28.3 ± 5.3 ^c

Locomotor and explorative activity was registered in the holeboard test on pnd 46 for male and female animals administered with vehicle (Vh) or increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg) from pnd 28 to 45, and with saline (Sal) or MDMA (10 mg/kg twice daily) every 5 day from pnd 30 (until pnd 45). The data are expressed as the mean ± S.E.M. In parenthesis, the number of animals per experimental group. ANOVA ($P < 0.05$), ^b significant overall effect of THC; ^c significant overall effect of MDMA treatment.

TABLE 3. General activity in an square arena

		Total ambulation (m)	Rearing frequency	Internal time (%)
Males	Vh-Sal (16)	11.82 ± 1.21	9.3 ± 2.2	14.5 ± 3.9
	Vh-MDMA (14)	9.33 ± 1.12	7.1 ± 1.3	8.7 ± 3.3 ^d
	THC-Sal (16)	11.87 ± 1.24	11.2 ± 2.9	6.1 ± 2.6 ^b
	THC-MDMA (14)	9.80 ± 1.39	9.1 ± 2.3	8.0 ± 4.5 ^b
Females	Vh-Sal (16)	18.86 ± 1.62 ^a	21.4 ± 4.2 ^a	14.5 ± 4.4
	Vh-MDMA (14)	17.52 ± 0.87 ^a	22.6 ± 2.3 ^a	4.9 ± 0.9 ^d
	THC-Sal (16)	17.00 ± 0.94 ^a	20.1 ± 3.2 ^a	4.2 ± 0.9 ^b
	THC-MDMA (12)	17.71 ± 1.23 ^a	24.2 ± 2.8 ^a	7.1 ± 1.7 ^b

Locomotor and behavioral parameters registered on pnd 71 of male and female animals administered with vehicle (Vh) or increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg) from pnd 28 to 45, and with saline (Sal) or MDMA (10 mg/kg twice daily) every 5 day from pnd 30 to pnd 45. The data are expressed as the mean ± SEM. In parenthesis, the number of animals per experimental group. ANOVA (P<0.05), ^a significant overall effect of sex; ^b significant overall effect of THC; ^d significant effect of MDMA in vehicle-treated animals.

TABLE 4. Endocrine measurements**TABLE 4.** Endocrine measurements

		Corticosterone		Leptin	
		Young Adult	Adult	Young Adult	Adult
Males	Vh-Sal	189.4 ± 49.5 (10)	363.2 ± 50.8 (10)	5.2 ± 0.6 (8)	13.2 ± 2.1 (7)
	Vh-MDMA	127.9 ± 36.0 (8)	259.8 ± 53.3 ^g (8)	4.2 ± 0.5 (6)	14.3 ± 2.5 (7)
	THC-Sal	155.8 ± 43.5 (10)	333.3 ± 33.9 (10)	4.1 ± 0.6 (8)	12.7 ± 1.5 (9)
	THC-MDMA	178.7 ± 31.4 (8)	210.4 ± 50.8 ^g (8)	4.4 ± 1.4 (6)	13.1 ± 1.0 (6)
Females	Vh-Sal	415.9 ± 69.8 ^a (10)	795.8 ± 112.4 ^a (10)	6.0 ± 0.9 (9)	8.6 ± 1.0 ^a (10)
	Vh-MDMA	476.1 ± 48.1 ^a (8)	749.6 ± 144.8 ^a (8)	4.5 ± 0.7 (8)	7.7 ± 1.2 ^a (8)
	THC-Sal	446.2 ± 58.7 ^a (10)	659.7 ± 62.9 ^a (10)	4.2 ± 0.8 ^c (9)	6.9 ± 1.5 ^a (9)
	THC-MDMA	454.9 ± 42.1 ^a (6)	684.0 ± 79.1 ^a (6)	2.9 ± 0.7 ^c (6)	7.2 ± 1.6 ^a (5)

Plasma corticosterone and leptin levels (mean ± SEM, ng/ml), in young adolescent (pnd 50) or adult animals (sacrificed around pnd 90). Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg) or vehicle from pnd 28 to 45, and to MDMA (10 mg/kg) or saline twice daily every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). In parenthesis, the number of animals per experimental group.

ANOVA (P<0.05), ^a significant overall effect of sex; ^c significant overall effect of THC within the same sex group; ^g significant MDMA effect within the same sex group.

TABLE 5. Hypothalamic expression of prepro-orexin transcripts**TABLE 5.** Hypothalamic expression of prepro-orexin transcripts

	Males	Females
Vh-Sal	1.00 ± 0.22 (6)	1.00 ± 0.31 (6)
Vh-MDMA	0.56 ± 0.29 (5)	0.66 ± 0.15 (3)
THC-Sal	0.12 ± 0.07 ^h (5)	0.68 ± 0.23 (5)
THC-MDMA	0.87 ± 0.38 (5)	1.17 ± 0.39 (6)

Quantitative real-time PCR analysis of hypothalamic preproorexin expression in adult animals sacrificed around pnd 90. Animals were exposed to increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle) from pnd 28 to 45, and to MDMA (10 mg/kg or saline) twice a day every 5 days from pnd 30 to 45 (see text for details). Levels of prepro-orexin mRNA (mean ± S.E.M.) are expressed in arbitrary units in reference to the control animals (Vh-Sal) of their corresponding sex group. In parenthesis, the number of animals per experimental group. ANOVA (P<0.05): ^h significant effect of THC in saline-treated male animals.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

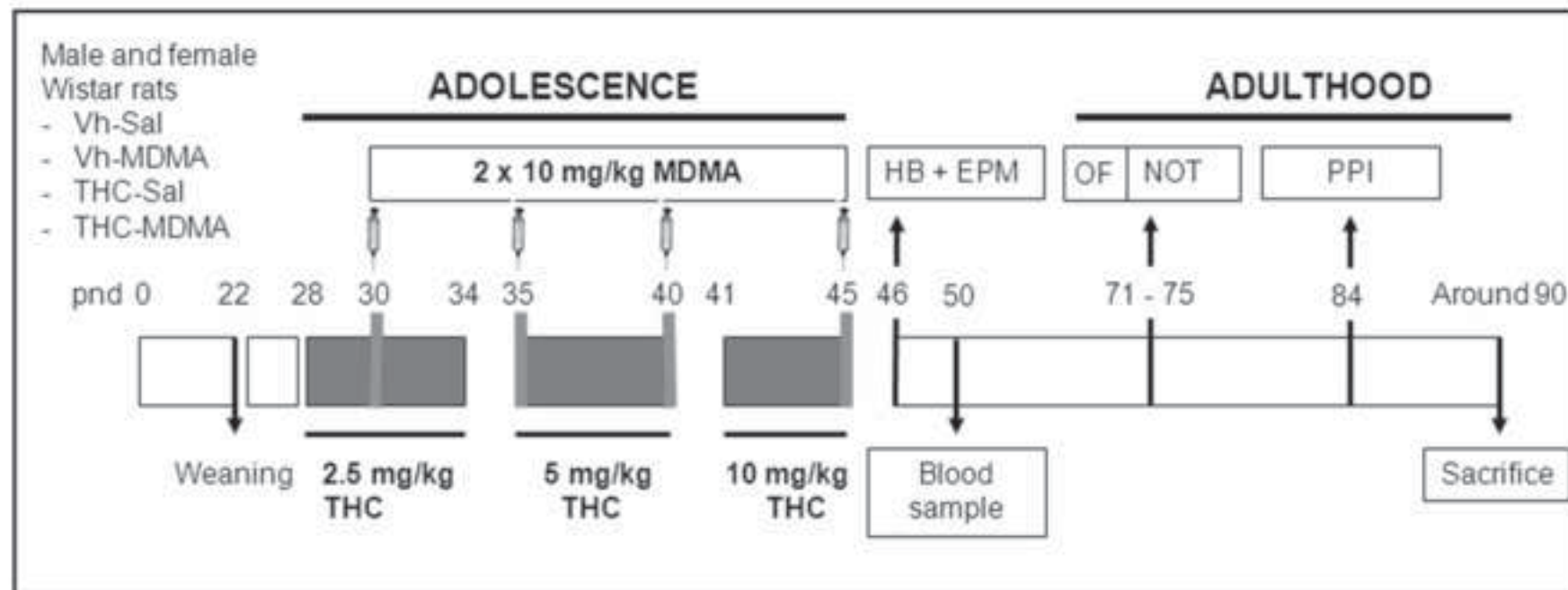


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

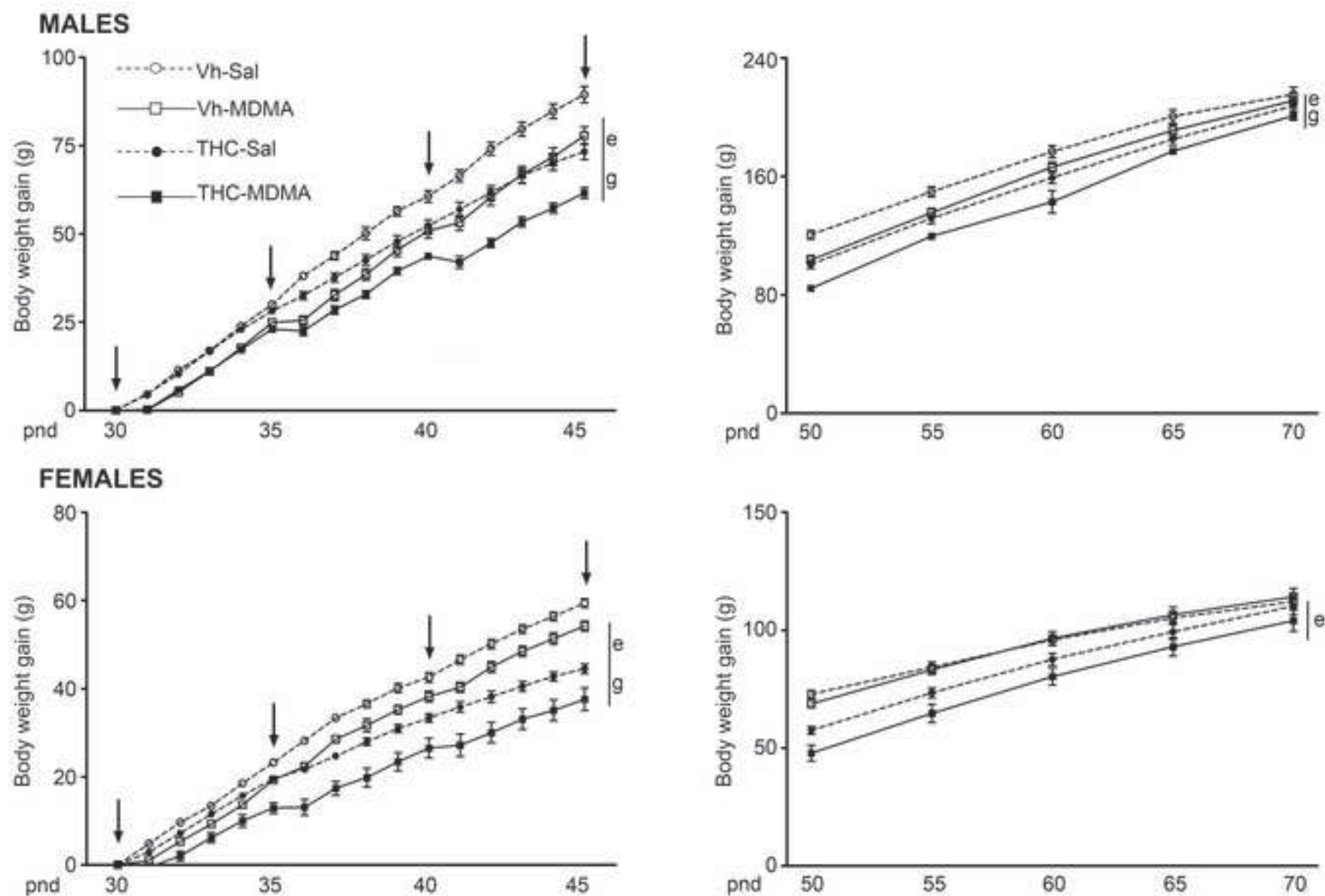


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

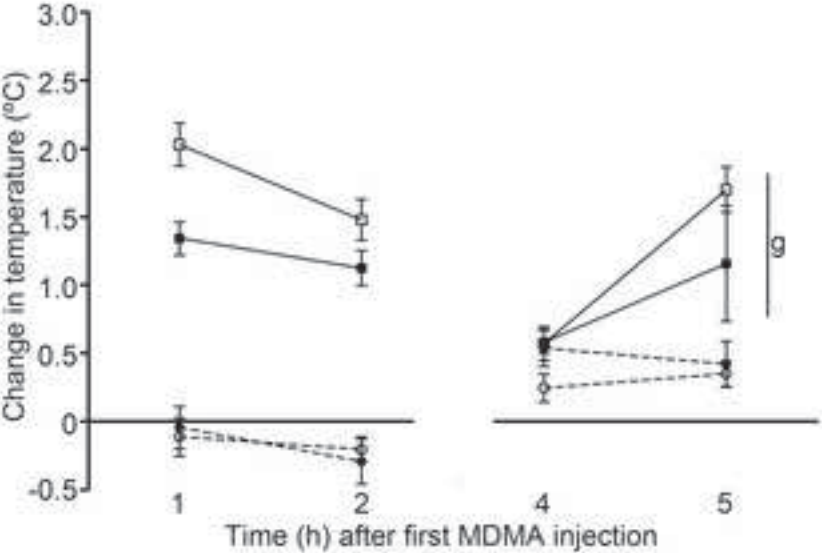
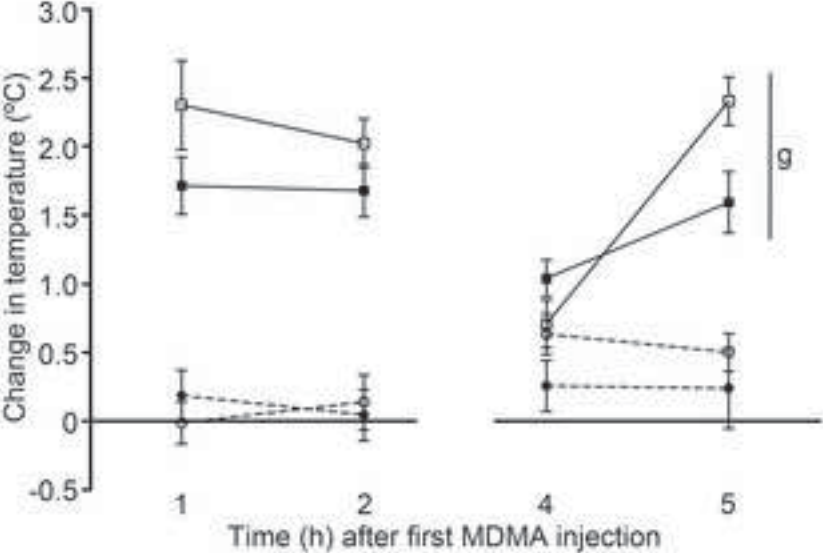
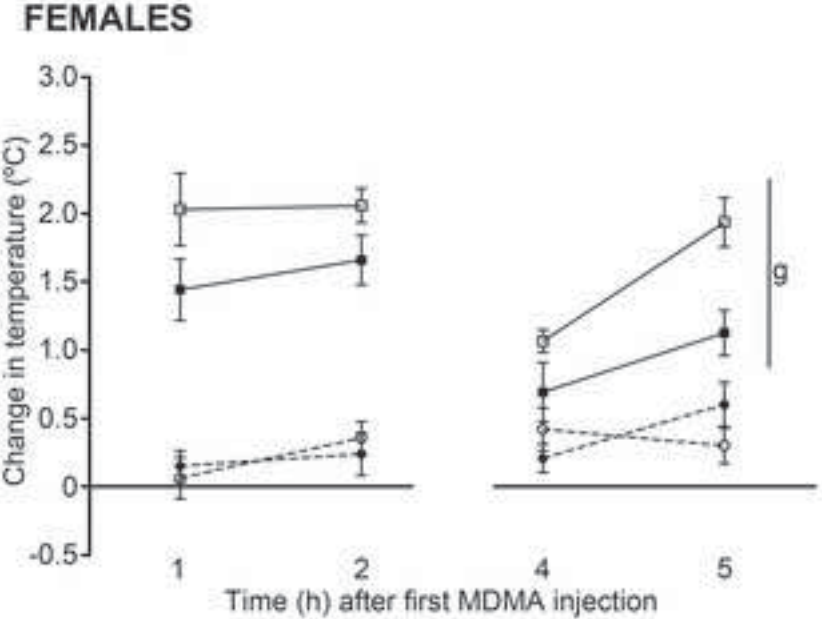
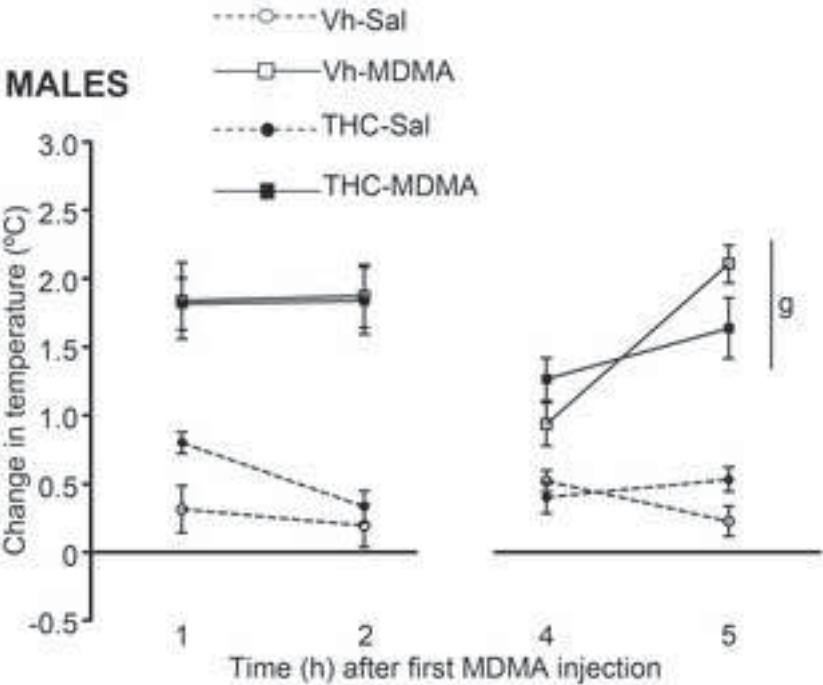


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

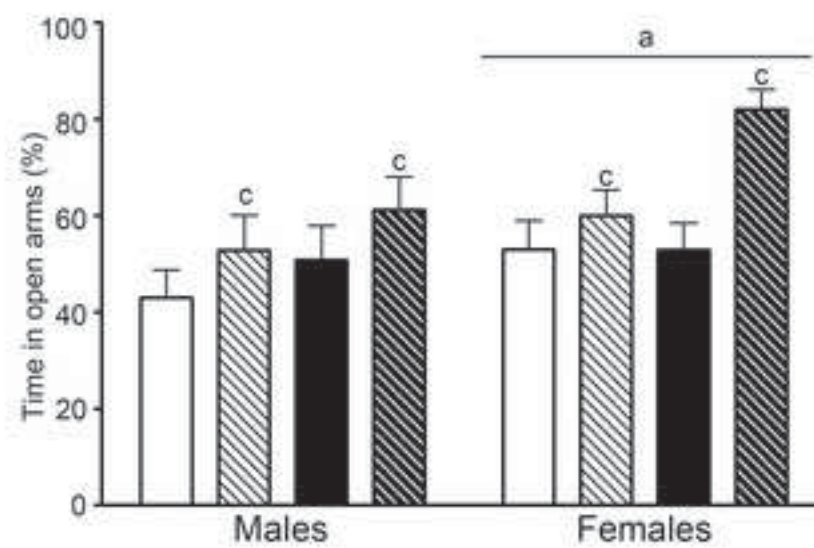
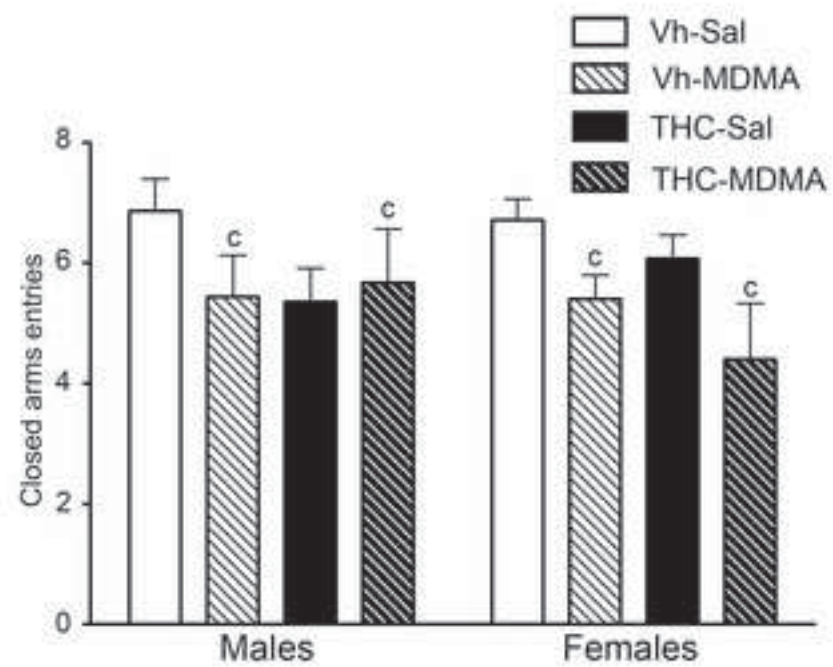


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

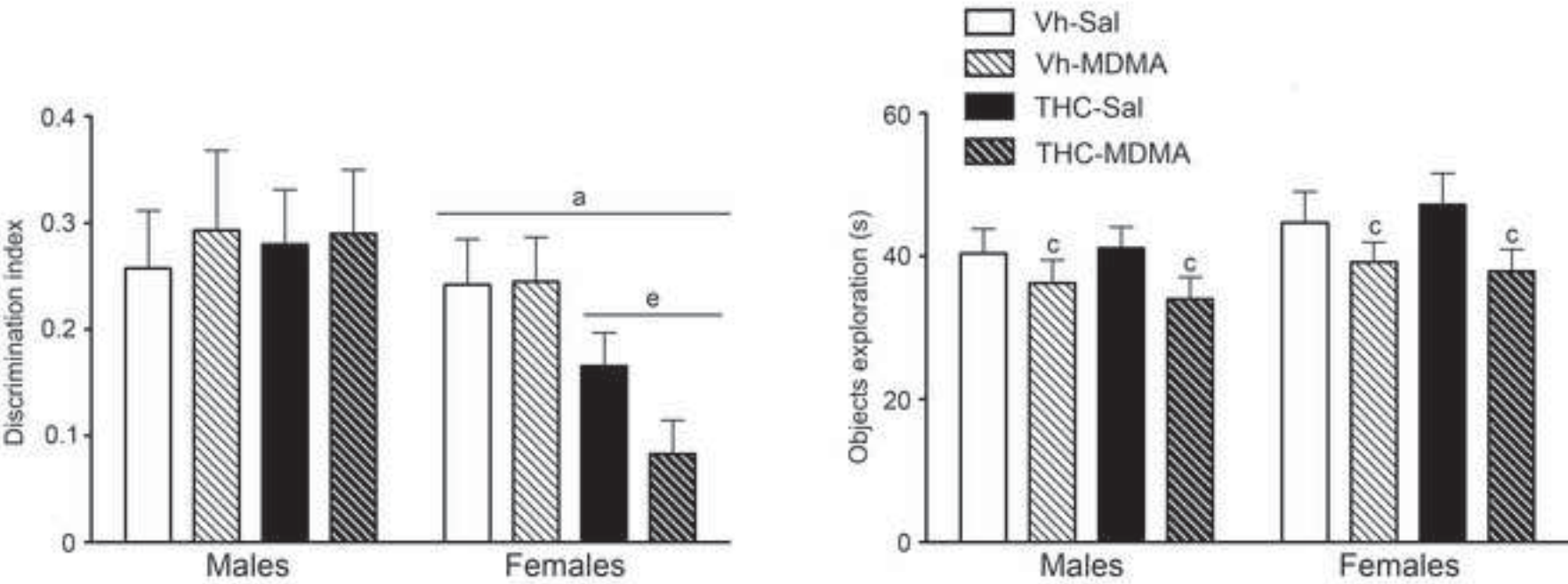


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

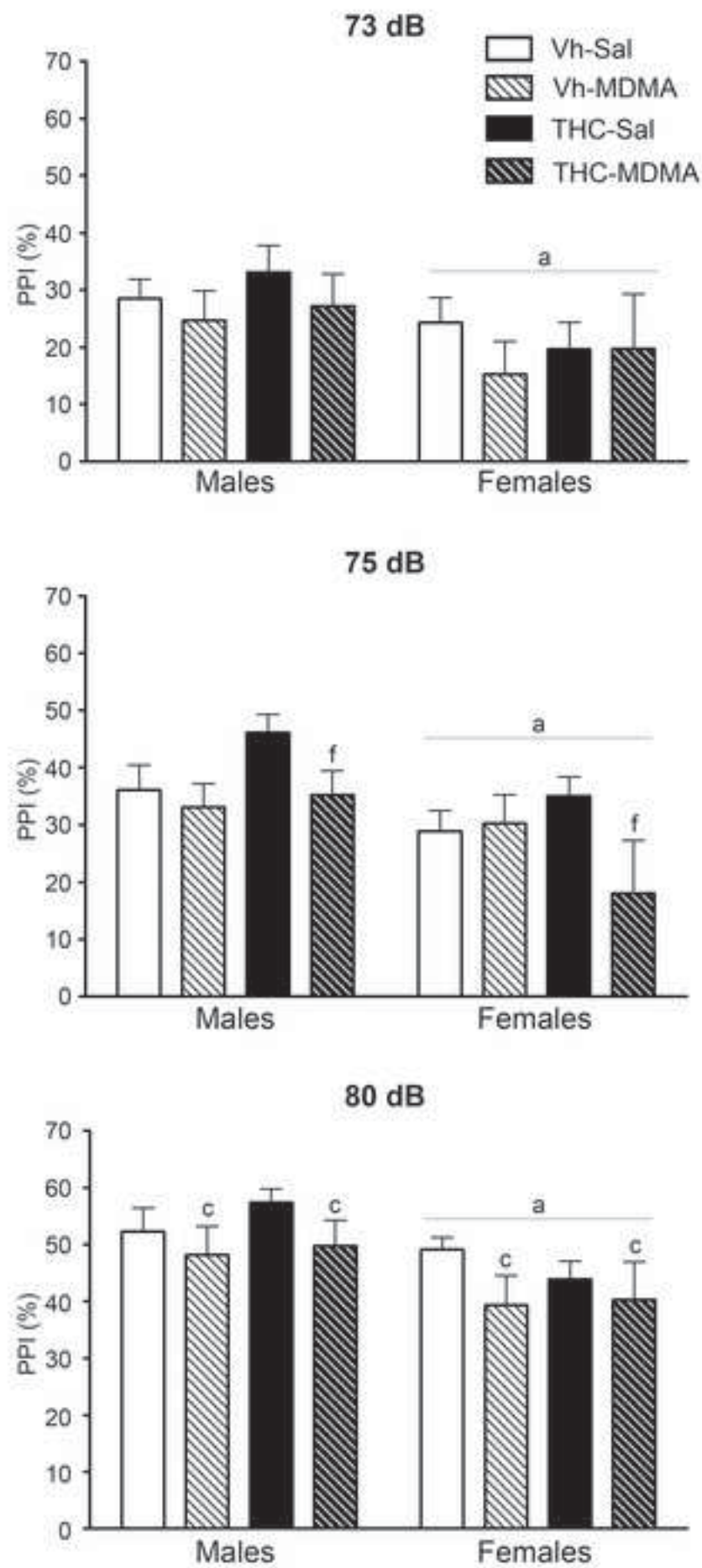
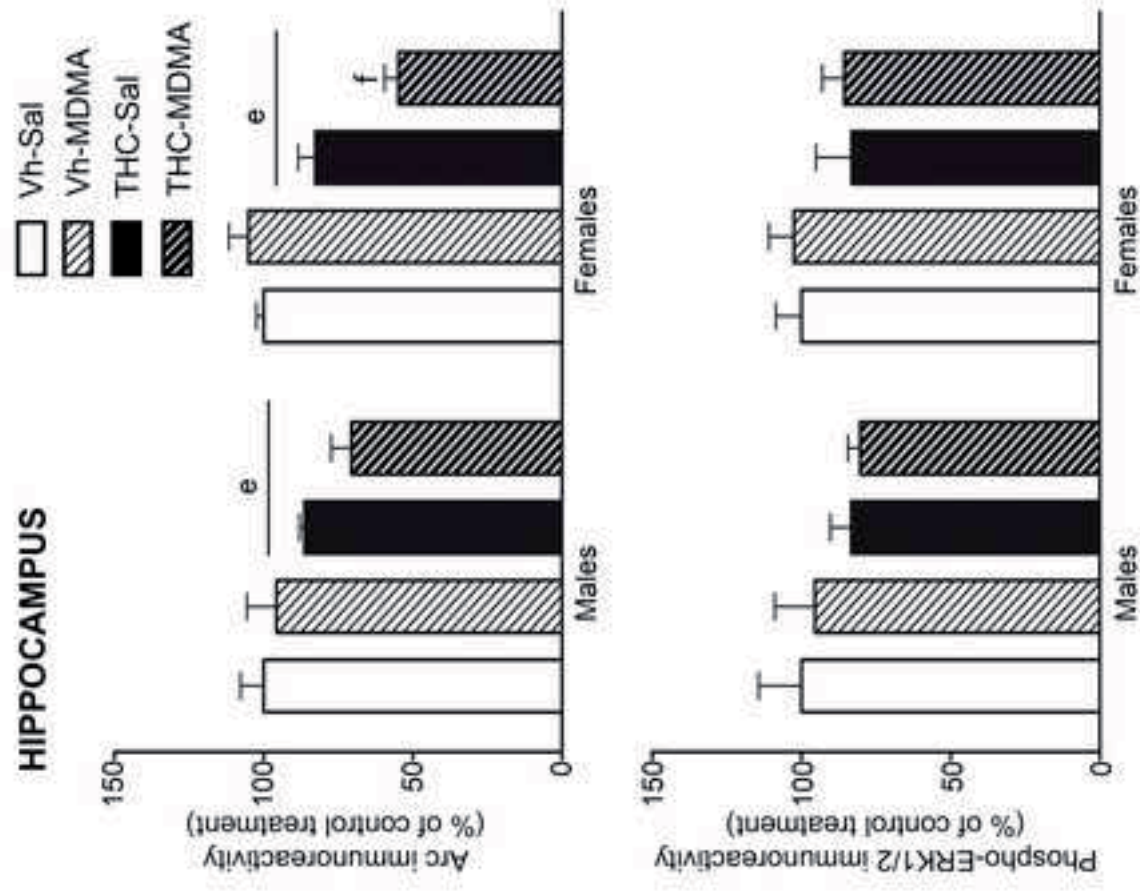
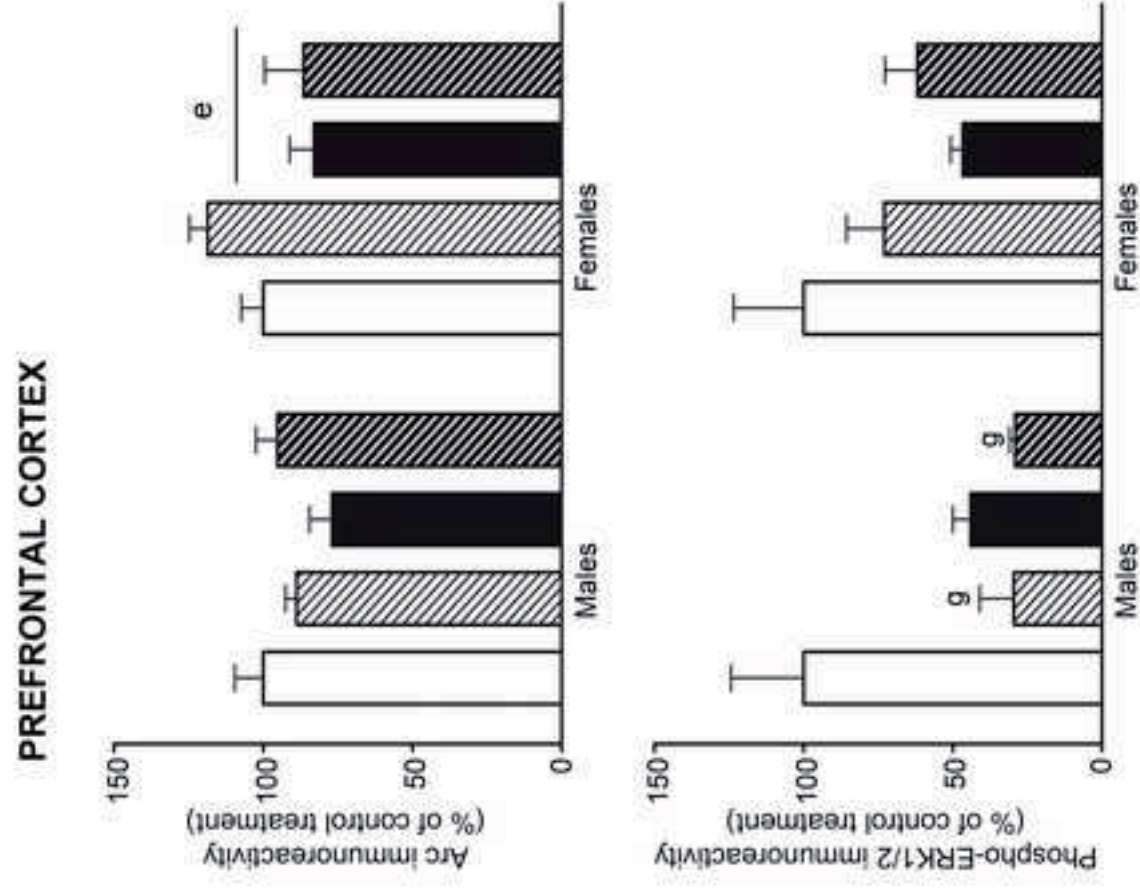


Figure 7

[Click here to download high resolution image](#)



TITLE: SEX DEPENDENT LONG-TERM EFFECTS OF ADOLESCENT
EXPOSURE TO THC AND/OR MDMA ON NEUROINFLAMMATION AND
SEROTONINERGIC AND CANNABINOID SYSTEMS IN RATS

AUTHORS:

Ana Belen Lopez-Rodriguez (1,2), Alvaro Llorente-Berzal (1), Luis M. Garcia-Segura
(2), Maria-Paz Viveros (1)*.

1. Department of Animal Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology,
Complutense University of Madrid - Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital
Clínico San Carlos (IdISSC), Spain.

2. Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid,
Spain.

* Address correspondence to Maria-Paz Viveros Department of Animal Physiology
(Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid. Calle
Jose Antonio Novais, 2. Complutense University of Madrid. 28040. Madrid, Spain.
Email: pazviver@bio.ucm.es

1 **SUMMARY**

2 **BACKGROUND AND PURPOSE:** Many young people consume ecstasy as a
3 recreational drug during the week-ends and often in combination with cannabis. In this
4 study we aimed to mimic human consumption patterns and investigated, in male and
5 female animals, the long-term effects of THC and MDMA on diverse
6 neuroinflammation and neurotoxic markers.

7 **EXPERIMENTAL APPROACH:** Male and female Wistar rats were chronically
8 treated with increasing doses of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and/or 3,4-
9 methylenedioxymethamphetamine (MDMA) during adolescence. The effects of THC
10 and/or MDMA on glial reactivity and on serotonergic and cannabinoid systems were
11 assessed by immunohistochemistry in the hippocampus and parietal cortex.

12 **KEY RESULTS:** THC significantly increased GFAP stained area in both sexes. In
13 males, both drugs either separately or in combination induced a significant increase of
14 the percentage of reactive microglia cells (Iba-1). In contrast, in females, each drug,
15 when administered alone produced a significant decrease of this percentage, whereas the
16 combination of both drugs resulted in a “normalization” to control values. In males,
17 MDMA reduced the number of SERT+ fibres, THC induced the opposite effect and the
18 group receiving both drugs did not significantly differ from the controls. In females,
19 MDMA reduced the number of SERT+ fibres and the combination of both drugs
20 counteracted this effect. Regarding CB1R, THC induced a significant reduction of this
21 receptor in females and this effect was aggravated by the combination with MDMA.

22 **CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS:** The present results indicate that adolescent
23 exposure to THC and/or MDMA induces long-term, sex-dependent neurochemical and
24 glial alterations and reveal interactions between the two drugs.

KEYWORDS (8): Adolescence, THC, MDMA, astrocytes, reactive microglia, CB1
receptor, serotonin transporter, sex differences.

For Peer Review

INTRODUCTION

Polydrug use among young people is a very frequent phenomenon and has augmented in the last years. In particular, cannabis is the most widely taken illegal co-drug in MDMA users, especially among younger adults (Schulz, 2011; Parrott et al., 2007). Thus, 98% of the ecstasy users also had taken cannabis in a sample of East Coast college students (Wish et al. 2006). Motivation for polydrug use might be influenced by psychophysiological aspects, for example, the transient relief exerted by one of the drugs of some undesired effects caused by the other substance. Specifically, acute cannabis consumption has been described by MDMA (ecstasy) abusers as a symptomatic relief against the feeling of anhedonia and depression which follows ecstasy's high (see Schulz, 2011; Parrott et al., 2007 for a review).

Cannabis is the most commonly used illicit drug among young people in Europe (EMCDDA, 2012). It is obtained from extracts of the hemp *Cannabis sativa* and its main psychotropic substance is delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) (Klein et al., 2011; Bossong and Niesink, 2010). THC binds to cannabinoid CB1 receptors (CB1R) that are highly expressed in the brain and are involved in multiple functions, including neural development (Keimpema et al., 2011), inflammation (Wolf et al., 2008; Massi et al., 2008) and anxiety and stress responses (Viveros et al., 2005; 2007; 2011) among many others aspects of homeostasis (Marco et al., 2012). Many studies demonstrate that cannabis produces severe behavioural and neurophysiological impairments and that these deficits are more evident when this substance is taken during critical developmental periods like adolescence (Viveros et al., 2012). In fact, previous reports have shown that chronic adolescent administration of CB1R agonists induces alterations of the emotional behaviour, the cognitive function as well as psychotic-like

1 symptomatology in adult rats (Llorente-Berzal et al., 2011, 2013a; Zamberletti et al.,
2 2012; Mateos et al., 2011; Schneider and Koch, 2003, 2007; O'Shea et al., 2004, 2006;
3 Biscaia et al., 2003). CB1R agonists during adolescence also induces long-term
4 neurochemical changes in the brain (Llorente-Berzal et al., 2013a; Rubino et al., 2008)
5 and sex-dependent changes in expression and functionality of hippocampal CB1Rs
6 (López-Gallardo et al., 2012; Mateos et al., 2011).

7
8 Regarding the involvement of the endocannabinoid system in the control of
9 neuroinflammation it has been reported that glial cells, astrocytes and microglia cells,
10 express cannabinoid receptors (Stella, 2010) that contribute to modulate the
11 inflammatory response. Marchalant et al., (2007) showed that WIN-55212-2, a synthetic
12 cannabinoid agonist, produced a decrease in the number of activated microglia after a
13 treatment with LPS, suggesting that the cannabinoid system may play a role in the
14 control of microglia reactivity in response to an insult.

15
16 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or ecstasy), is a psychostimulant drug
17 usually consumed by young adults attending a range of different nightlife venues
18 (EMCDDA, 2012; Parrot, 2004). MDMA is an analogue of methamphetamine which
19 induces a rapid release of serotonin and inhibition of its reuptake, affecting also other
20 neurotransmitters such as dopamine and norepinephrine (Baumann et al., 2007) and
21 increases the metabolic activity and the production of free radical and oxidative stress
22 (Parrot, 2004). The most consistent effect of MDMA exposure in rats is a serotonergic
23 deficit in various regions of the forebrain, including striatum, hippocampus, and cortex
24 (Piper et al., 2007; Battaglia et al., 1991). Other indicators of MDMA-related insults are
25 markers of neurotoxicity such as cell death rate (Schmued, 2003), GFAP levels

(Johnson et al., 2002; Frau et al., 2013), and neuroinflammation via activation of microglial cells (Monks et al., 2004; Connor et al., 2005). Although it is known that MDMA consumption during adolescence induces several long-lasting behavioural impairments on mood and cognitive function (Piper et al., 2007; Llorente-Berzal et al 2013a) there is scarce information about long-lasting neurotoxicity induced by adolescent MDMA exposure.

A critical factor to be considered regarding drug use and abuse is that sex differences affect many psychobiological aspects including addiction (Viveros et al., 2006, 2009, 2011; Carroll et al., 2004,). For example, clinical studies have shown that females are more susceptible to the effects of drugs of abuse (Carroll et al., 2004). In particular, the majority of research in humans suggests that women are more likely to be affected by cannabinoids than men (Craft et al 2013). We have extensively studied sexual dimorphisms after chronic cannabinoid treatment during adolescence, which has allowed us to show an important number of sex differences affecting behavioural, endocrine and neuronal parameters (see for review Viveros et al., 2011, 2012), as well as sex-dependent effects on glial cells (GFAP + cells) (López-Gallardo et al., 2012). Though there have been only a few studies that have focused on sexual dimorphisms in responses to MDMA in adult animals, a number of sex differences have been reported. Thus, female animals are more sensitive than males to the locomotor effects of MDMA (Walker et al., 2007; Palenicek et al., 2005), and MDMA induced in female rats lower levels of acoustic startle response in the prepulse inhibition test than in males (Bubenikova et al., 2005). Moreover, we have recently found that males were more sensitive than females to the rewarding effects of an adolescent treatment with MDMA, as assessed by the conditioned place preference (Llorente-Berzal et al., 2013b). Sexual

1 differences in both, cannabinoid and MDMA-induced effects can be attributed to both
2 pharmacodynamic and pharmacokinetic factors (Craft et al 2013; Fonsart et al., 2009).

3

4 In a recent study we have reported long-term endocrine, behavioural and molecular
5 effects of an adolescent treatment with THC and/or MDMA by using a protocol that
6 mimics the pattern of drug consumption in young humans (Llorente-Berzal et al 2013a).

7 In brief, we used a MDMA administration schedule based on Meyer et al. (2008) who
8 developed and characterised an animal model that mimics human MDMA weekend
9 consumption, while THC was daily administered in an increasing dose regime (Rubino

10 et al., 2008). The specific chronic and escalating THC administration schedule was
11 chosen because 1) a substantial proportion of cannabis users develop stable use patterns

12 characterised by continuous use of cannabis (Ramaekers et al., 2011) and 2) chronic

13 cannabinoid administration usually induces tolerance to many of the effects of THC

14 (Childer, 2006). In the present study, we carried out an immunohistochemical analysis

15 in the hippocampus and parietal cortex of animals employed in our previous

16 experiments (Llorente-Berzal et al., 2013a). In particular, we focused on glial

17 (astrocytes and microglia) cells and on serotonin transporter and CB1 cannabinoid

18 receptors. In view of the numerous sexual dimorphisms found in our previous study

19 (Llorente-Berzal et al., 2013a), we also analysed here males and females. The present

20 results demonstrate that a chronic treatment during adolescence with THC and/or

21 MDMA induces sex-dependent long-term effects on astrocyte and reactive microglia

22 markers as well as on CB1 receptor expression and serotonergic neurotoxicity. As we

23 discuss below, some of these effects might be related to behavioural outcomes reported

24 previously and, as in our previous study, we also reveal here functional interactions

25 between both drugs.

1 **METHODS**

2 **Animals**

3 Experimental subjects were the offsprings of *Wistar* albino rats purchased from Harlan
4 Laboratories (Milan, Italy) which were mated (one male x two females) at least 2 weeks
5 after their arrival. After 10 days females were single housed and control of birth was
6 strictly controlled. On day of birth, postnatal day (pnd) 0, litters were culled and sex
7 balanced to eight pups per dam (four males and four females). Pups were left
8 undisturbed until pnd 22 when they were separately housed in pairs of siblings of the
9 same sex per cage. A total of 128 animals coming from 16 litters were used for the
10 present experiment. All animals were maintained at constant conditions of temperature
11 (22 ± 2 °C) and humidity (50 ± 2 %) in a reverse 12 h dark/light cycle (lights on at 20.00),
12 with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; Safe, Augy, France) and
13 water until they were sacrificed at pnd 89-92. Experiments are in compliance with the
14 Spanish Royal Decree 1201/2005, October 21, 2005 (BOE n° 252) about protection of
15 experimental animals, in close agreement with the European Communities Council
16 Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). In addition, the local Animal Ethics
17 Committee approved the present experimental protocol. All efforts were made to
18 minimize animal suffering and distress.

19

20 **Pharmacological treatments**

21 Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC, commercialized as dronabinol) was purchased
22 from THC Pharm GmbH (Frankfurt, Germany) and dispersed in ethanol, cremophor
23 (Sigma-Aldrich, Spain) and saline (1:1:18) as in previous experiments (Llorente-Berzal
24 et al., 2011; Llorente et al., 2007). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)
25 hydrochloride was purchased from Lipomed (Arlesheim, Switzerland) and solutions

were daily prepared in saline (0.9% NaCl). Drug treatments were restricted to the adolescent period, from pnd 28 to pnd 45 (Spear, 2000) where animals received intraperitoneal injections of increasing doses of THC (2.5 mg/kg from pnd 28 to 34; 5 mg/kg from pnd 35 to 40; 10 mg/kg from pnd 41 to 45) or vehicle, according to a slightly modified protocol from Rubino et al. (2008), the assignment to each group was by random and under blind code during all the experiment. Additionally, every five days, from pnd 30, animals received two daily injections of MDMA (10 mg/kg, s.c., calculated as the salt) or saline (Sal), with an inter-dose interval of 4 h, following a modified protocol from Meyer et al. (2008). Both drugs were administered at a volume of 2 ml/kg (see Fig. 1). Methodological details and results obtained in the first part of this study are explained in Llorente-Berzal et al. (2013a).

PLEASE INSERT FIGURE 1 OVER HERE

Tissue Fixation and Immunohistochemistry

For histological analysis, at adulthood (pnd 89-92), a total of 48 animals (6 animals per experimental group) were anaesthetized with sodium pentobarbital (100mg/Kg, i.p.; Vetoquinol, San Fernando de Henares, Spain) and perfused intracardially, first with saline (0.9% NaCl) and then with fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer). Brains were removed and immersed overnight at 4°C in the same fixative solution and then rinsed with phosphate buffer. Coronal sections, 50 µm thick, were obtained using a Vibratome (VT 1000 S, Leica Microsystems. Wetzlar, Germany) and each batch of sections was used for an independent immunohistochemical marker. Sections for all animals were processed for all the studied antigens. Immunohistochemistry was carried out on free-floating sections. All washes and incubations were done in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, containing 0.3% bovine serum

1 albumin and 0.3% triton X-100. The endogenous peroxidase activity was quenched in a
2 solution of 3% hydrogen peroxide in 30% methanol. Sections were incubated overnight
3 at 4°C with either a rabbit polyclonal antibody against GFAP (glial fibrillar acidic
4 protein) a marker of astrocytes reactivity (diluted 1:1000; Dako, Glostrup, Denmark), a
5 rabbit polyclonal antibody against Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) a
6 marker of microglia (diluted 1:2000; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), a
7 rabbit polyclonal antibody against serotonin transporter (diluted 1:500; Calbiochem,
8 Darmstadt, Germany) and a rabbit polyclonal antibody against cannabinoid receptor 1
9 (diluted 1:500; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). For these last two antibodies, a
10 previous antigen retrieval step was needed (10mM sodium citrate buffer, pH 8.7, 85°C).
11 After primary antibodies, sections were incubated for 2 hours with biotinylated goat
12 anti-rabbit immunoglobulin G (diluted 1:300; Pierce, Rockford, IL, USA). After several
13 washes, sections were incubated for 90 min with avidin-biotin-peroxidase complex
14 (diluted 1:250; ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce, Rockford, IL, USA)
15 and the reaction product was revealed with 2 µg/mL 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-
16 Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.01% hydrogen peroxide in 0.1 M phosphate buffer.
17 Finally, sections were dehydrated, mounted on gelatinized slides, coverslipped, and
18 examined with a Leitz Laborlux microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).
19 Incubation of the tissue without the primary antibody was used as a control for
20 immunohistochemistry. The hippocampus and parietal cortex were selected for
21 immunohistochemical assessments for the following reasons. The implication of the
22 hippocampus in cognition and memory is well known, and heavy MDMA users show
23 an impaired cognitive function including memory deficits (Quednow et al., 2006, 2007).
24 Moreover, recent data have shown oxidative damage in the hippocampus of mice
25 acutely treated with MDMA (Ros-Simó et al., 2013). CB1 receptors are highly

expressed in the hippocampus (Herkenham et al., 1990) and are crucially involved in cognitive function and memory (Moreira and Lutz, 2008; Sullivan, 2000). Chronic exposure to THC in adolescent rats has been shown to induce long-term alterations of hippocampal CB1 receptors, BDNF and GFAP (López-Gallardo et al., 2012) as well as memory deficits (Mateos et al., 2011; Rubino et al., 2009a, 2009b; Schneider and Koch, 2003). Regarding the measurement of SERT density surface in parietal cortex, we selected this area for technical reasons. In the hippocampus or other areas such as the amygdala, the disposition of SERT fibres is diffuse whereas in the cortex it is very similar to a net where we can relatively easily distinguish vertical and horizontal fibres and quantify the surface density.

Morphometric Analysis

We examined every section obtained from 2.5 mm to -2 mm Bregma (Paxinos and Watson, 1998) in blind code. Sections from 4 to 6 animals in each experimental group were analysed, all of them in blind code. GFAP presence was determined in the hilus area of the hippocampus by the calculation of the percentage of area immunostained for GFAP in high-quality microphotographs taken under the 10x objective. Six counting frames per animal were analysed by measuring densitometry with the software ImageJ 1.46o (NIH, USA). The images were all changed to binary code and the positive staining was used to set the threshold, then, by using always the same measure area, the optical density was automatically determined and the percentage of stained area was calculated over the total area of the microphotograph.

The morphology of Iba-1 immunoreactive microglia was assessed with the 40x objective. Cells were classified, as described in (Diz-Chaves et al. 2012), in five morphological types: Type I, cells with few cellular processes (two or less); Type II,

1 cells showing three to five short branches; Type III, cells with numerous (>5) and
2 longer cell processes and a small cell body; Type IV, cells with large somas and
3 retracted and thicker processes and Type V, cells with amoeboid cell body, numerous
4 short processes and intense Iba-1 immunostaining. Iba1-immunoreactive cells Type III,
5 IV and V were classified as reactive microglia (Diz-Chaves et al. 2012). For each
6 animal we analysed a total of 100 cells within four different slices in the hilus area of
7 the hippocampus and classified them into one of the five groups to finally sum them and
8 determine the percentage of each group over the total.

9 Serotonin transporter (SERT) expression was assessed by analysing the surface density
10 of SERT positive (+) fibres within the parietal cortex area on high-resolution
11 microphotographs taken with the 40x objective. The surface density of SERT positive
12 fibers was estimated according to the method of Weibel (1979) using a morphometric
13 grid defining an area of 195 x 146µm and presenting vertical and horizontal lines
14 separated by a distance of 30µm. The grid was superimposed over the microphotograph
15 and we counted the number of vertical and horizontal intersections of the lines of the
16 grid with the SERT positive fibres, then the total number of intersections was summed.

17 Quantification of CB1 immunostaining was carried out on high-resolution
18 microphotographs taken with the 10x objective and under the same conditions of light
19 and contrast, by measuring optical density using the software ImageJ 1.46o (NIH, USA)
20 because this antibody presents a punctuate and diffuse staining. We analysed five slices
21 per animal and focused on CA1 and CA3 areas of Ammon's horn and the hilus of the
22 dentate gyrus of the hippocampus.

23

24 **Statistical analysis**

Data were analysed using a three-way analysis of variance (ANOVA), with factors being sex (males vs. females), cannabinoid treatment (Vh vs. THC) and intermittent MDMA administration (Sal vs. MDMA). Normality and homocedasticity were assessed with Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. When necessary, data were transformed to achieve a normal distribution. Post hoc comparisons were performed by using the Bonferroni test with a level of significance $p < 0.05$. In the case of CB1 data, additional Student's t-tests were performed between control males and females, as detailed in the results section. Statistical analyses were carried out with the SPSS 19.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

GFAP

The analysis of the percentage of area immunoreactive for GFAP by a three-way ANOVA rendered a significant effect of THC treatment [$F(1,35)=40.85$; $p < 0.001$] and a significant interaction between THC and MDMA, [$F(1,35)=17.32$; $p < 0.001$].

As Figure 2 shows, THC induced a significant increase in the number of GFAP in both sexes, and the same trend was observed for MDMA. No additive effects were found when both drugs were administered in combination. Rather, in females MDMA tended to counteract the effect of THC.

PLEASE INSERT FIGURE 2 OVER HERE

Iba-1

1 Three-way ANOVA of the percentage of microglia cells with reactive phenotype
2 rendered significant effects of THC [$F(1,34)=16.31$; $p<0.001$] and MDMA
3 [$F(1,34)=4.79$; $p<0.05$], significant interactions between sex and THC [$F(1,34)=10.74$;
4 $p<0.01$] and the two pharmacological treatments (THC x MDMA) [$F(1,34)=5.76$;
5 $p<0.05$] and a significant triple interaction [$F(1,34)=34.72$; $p<0.001$]. Post hoc
6 comparisons (Fig 3) revealed a significant difference between male and female control
7 groups with females exhibiting higher levels of reactive microglial cells. In males, both
8 drugs either separately or in combination induced a significant increase of the
9 percentage of reactive microglia cells. In contrast, in females, each drug, when
10 administered alone produced a significant decrease of this parameter, whereas the
11 combination of both drugs resulted in “normalization” to control values (see Fig 3).

12

13 PLEASE INSERT FIGURE 3 OVER HERE

14

15 **SERT**

16 Three-way ANOVA of the number of SERT+ fibres rendered significant effects of sex
17 [$F(1,35)=26.16$; $p<0.001$], THC [$F(1,35)=100.93$; $p<0.001$] and MDMA
18 [$F(1,35)=102.61$; $p<0.001$]. It also revealed that the double sex x THC interaction
19 [$F(1,35)=4.84$; $p<0.05$] and the triple interaction [$F(1,35)=4.61$; $p<0.05$] were
20 significant. Post hoc comparisons showed a significant difference between control male
21 and female animals. In addition, in males, MDMA induced the expected significant
22 reduction of SERT + fibers, THC induced the opposite effect, i. e., a significant increase
23 in this parameter, and the group receiving both drugs did not significantly differ from
24 the control group. In females, MDMA reduced the number of SERT + fibers and, in

1 absence of any effect of THC *per se*, the combination of both drugs counteracted the
2 effect of MDMA (Fig 4.).

3
4 PLEASE INSERT NEW FIGURE 4 OVER HERE
5

6 **CB1 receptor**

7 Optic densitometry of CB1R expression has been studied in three different areas of the
8 hippocampal formation: CA1, CA3 and hilus. The three-way ANOVA revealed, for
9 each hippocampal area studied a significant effect of the THC treatment [CA1:
10 $F(1,34)=5.34$; $p<0.05$, CA3: $F(1,34)=11.54$; $p<0.01$, hilus: $F(1,34)=10.69$; $p<0.01$] and
11 significant interactions between sex and THC [CA1: $F(1,34)=11.34$; $p<0.01$, CA3:
12 $F(1,34)=7.22$; $p<0.05$, hilus: $F(1,34)=4.94$; $p<0.05$]. Furthermore, in CA3, it also
13 rendered a significant effect of the MDMA treatment [$F(1,34)=7.70$; $p<0.01$]. Post hoc
14 comparisons did not reveal any difference among male animals, whereas, among
15 females, the group exposed to both drugs showed the lowest CB1 expression in the
16 three subareas analysed (Fig 5). A visual inspection of the histograms showed at least a
17 trend towards a higher CB1 expression in control females than in control males. In order
18 to clarify this point we carried out the corresponding comparisons by using Student's t-
19 test which rendered the following results: CA1 area, Vh-Sal Male vs. Vh-Sal Female,
20 $t=0.052$; CA3 area, Vh-Sal Male vs. Vh-Sal Female, $t=0.044$; hilus area, Vh-Sal Male
21 vs. Vh-Sal Female, $t=0.079$.

22
23 PLEASE INSERT NEW FIGURE 5 OVER HERE
24

25 **DISCUSSION AND CONCLUSIONS**

1 In spite of the frequent combined use and abuse of ecstasy and cannabis among
2 adolescents, little is known about the long-term consequences of this pattern of drug
3 consumption. To the best of our knowledge, only two experimental studies have
4 investigated the long-term impact of adolescent exposure to these drugs when they are
5 administered in combination, and both reports have focused on physiological and
6 behavioural parameters (Shen et al., 2011; Llorente-Berzal et al., 2013a). We provide
7 here the first evidence of sex-dependent persistent consequences of THC and/or MDMA
8 administration on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems.
9
10 MDMA (ecstasy) has neurotoxic and neuroinflammatory properties which are more
11 evident and potent in microglia than in astroglia (Frau et al., 2013). In agreement with
12 this observation, our results show that MDMA did not induce a significant effect on
13 GFAP immunoreactivity in the hippocampus whereas it did exert clear effects on
14 microglia reactivity. The above mentioned study, where the effects of MDMA on glial
15 reactivity were analysed in nucleus accumbens, striatum, substantia nigra, and cortex
16 showed that MDMA exerted its major effect in the striatum (Frau et al., 2013).
17 However, the hippocampus has not been extensively studied yet. The present results
18 show that, in this brain region, THC induced a significant increase in the percentage of
19 GFAP immunoreactive area in both sexes. Although a trend in the same direction was
20 observed for MDMA, no additive effects were found when both drugs were
21 administered in combination. Rather, in females, MDMA counteracted the effect of
22 THC, supporting other studies which report functional interactions between THC and
23 MDMA in the control of astrocytic activation (Tourinho et al., 2010). The mechanisms
24 underlying the interaction of MDMA and THC on astrocytes are unknown. THC may
25 have direct effect on astrocytes, which express cannabinoid receptors, or exert indirect

1 effects acting on neurons. In turn, MDMA may alter the release of neurotransmitters
2 that affect astrocyte function, such as serotonin (Quesseveur et al., 2013). Indeed, sex
3 differences in the levels of serotonin (Ortiz et al., 1988; Mitsushima et al., 2006) may
4 contribute to the different effect of MDMA on male and female astrocytes. Thus, it is
5 likely that the interaction of THC and MDMA on astrocytes is mediated by
6 modifications in neuro-glia cross talk.

7
8 The present results also show that, in males, both drugs either separately or in
9 combination induced a significant increase of the percentage of reactive microglia cells
10 (Iba-1). Previous studies have shown that an acute treatment with MDMA in male Dark
11 Agouti rats induced an increase in the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) (Orio et al.,
12 2004), which is a key mediator of microglia responses in health and disease (Giulian et
13 al., 1988; Sheng et al., 1996; Griffin et al., 1998) . With respect to THC, *in vitro* studies
14 with mouse cells have demonstrated that this compound modulates the bioactivity of IL-
15 1 β (Shivers et al., 1994), controlling the activation of microglia. Our present findings,
16 showing long term effects of MDMA and THC treatments on the percentage of reactive
17 microglia suggests that prolonged administration of these drugs may result in persistent
18 modifications of microglia reactivity.

19
20 The results that we found in females regarding the effects of the drugs on microglia
21 reactivity were just the opposite of the ones observed in males. Thus, in females, each
22 drug, when administered alone produced a significant decrease of the percentage of
23 reactive microglial cells, whereas the combination of both drugs resulted in a
24 “normalization” of this parameter which reached control values. It is important to
25 highlight that the basal state of microglia cells is completely different in male and

1 female control animals, with females presenting higher levels of cells with reactive
2 phenotype. These findings are in agreement with previous studies indicating that males
3 show more microglia cells at early postnatal development (pnd 4), whereas female rats
4 show a higher number of reactive microglia cells during adolescence and in adulthood
5 (pnd 30-60). This sex difference is extended to the levels of chemokines and the activity
6 of microglia cells, which may account for their different role and contribution in the
7 response to several insults (Schwartz et al., 2012). In view of these data, it is likely that
8 depending on the “starting” activational state of microglia, THC and MDMA produce
9 different effects. Previous studies have shown that WIN-55212-2, a synthetic
10 cannabinoid agonist, administered daily for 21 days to young male Sprague-Dawley
11 rats, decreased the number of activated microglia when it was administered together
12 with the proinflammatory molecule LPS; however it did not decrease the microglia
13 reactivity when LPS was not present (Marchalant et al., 2007). This observation
14 indicates that cannabinoid agonists may reduce the microglia reactivity when there is a
15 previous activated state. Furthermore, Marchalant et al (2007) also found that the
16 control of microglia reactivity mediated by this cannabinoid agonist occurred in the
17 dentate gyrus and CA1 of the hippocampal formation but not in CA3 or the enthorinal
18 cortex, which further indicates an area-dependent effect. The fact that in the present
19 study THC only reduced the percentage of microglia cells in females might be attributed
20 to their high percentage of reactive microglia in basal conditions when compared to
21 their male counterparts. Regarding the effects of MDMA on microglia cells in males
22 and females, Connor et al. (2005) have shown that MDMA administered acutely to male
23 Sprague-Dawley rats, increased the levels of the anti-inflammatory interleukin IL-10
24 and decreased the pro-inflammatory tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) when it was
25 co-administered with LPS *in vivo* and *in vitro* (Connor et al., 2005); and other authors

1 have found that MDMA exert pro-inflammatory effects when injected in basal conditions
2 (Tourinho et al., 2010). These findings suggest that MDMA also needs a previous
3 activated state of microglia cells to reduce the microglia reactive phenotype. In line with
4 this reasoning, and similar to what we described above for THC, our results indicate
5 that MDMA reduced the percentage of microglia cells with a reactive phenotype only in
6 females, which is the sex that showed more activated microglia cells in basal conditions.
7 The fact that THC and MDMA when administered separately significantly decreased
8 microglia activation with respect to the control group, what could be considered an
9 “anti-inflammatory” effect, should not be viewed as a beneficial effect since what the
10 drugs are doing is changing the baseline (physiological) situation. Also within females,
11 the combination of both drugs resulted in a return of the microglia activation to control
12 levels. To explain these results we propose the following explanation. According with
13 our experimental protocol (see Fig 1) the animals exposed to THC+MDMA had already
14 received two injections of THC before starting with the MDMA treatment. Thus, it is
15 likely that when MDMA began to be administered, THC had already reduced the
16 originally increased basal reactive microglia of females. In this situation, MDMA, that
17 appears to need a previous activated state to reduce microglia activation (Connor et al
18 2005) would have increased microglia activation (as it did in males), which would result
19 in a return to control values. It is known that CB2 receptors are present in microglia
20 cells and that depending on their activational state there are changes in the expression of
21 these cannabinoid receptors. In fact, CB2 receptors are highly expressed by activated
22 microglia (Ashton and Glass, 2007). Though an immunohistochemical analysis of these
23 receptors have not been included in this study, it is plausible that the treatments that
24 have induced an increase of reactive microglia have also caused an increase of CB2
25 receptor expression.

1
2 Many studies have demonstrated that MDMA produces a reduction of serotonin levels,
3 tryptophan hydroxylase and serotonin transporter (SERT) (Biezonski and Meyer, 2011;
4 Baumann et al., 2007; Piper et al., 2007). In agreement with these data, the present
5 results show that adolescent exposure to MDMA induced a long-term significant
6 reduction of SERT+ fibres in both sexes. This reduction has been classically considered
7 a neurotoxic effect of MDMA on serotonergic axons. However, nowadays there is
8 some evidence that points to a down-regulation of SERT gene expression induced by
9 MDMA (see for review Biezonski and Meyer, 2011). Therefore, the observed reduction
10 in the surface density of SERT+ fibres may be due to serotonergic axonal depletion
11 and/or to decreased SERT gene expression. Our findings also indicate that THC induced
12 a significant increase of SERT+ fibres in males with no changes in females. It is known
13 that the endocannabinoid system plays a crucial role in neurodevelopmental processes
14 during adolescence (Viveros et al., 2012) and modulates the activity of the
15 serotonergic system by inhibiting serotonin release via CB1R activation (Haj-
16 Dahmane and Shen, 2011). It may be that chronic THC treatment and the resulting
17 reduction of serotonin levels leads to a reorganization of serotonergic fibers which in
18 turn could be reflected in an increase of SERT expression in the parietal cortex. In fact,
19 previous data indicate that changes of the postnatal expression patterns of SERT may be
20 the result of a reorganization of the serotonergic innervation (Hansson et al., 1998). In
21 contrast with the present findings, Shen et al. (2011) did not find any significant
22 alteration of SERT expression in the parietal cortex of adult animals treated chronically
23 with THC (5 mg/kg/day) in the adolescent period. This apparent discrepancy might be
24 attributed to the very different kind of treatment, since in our case we administered
25 increasing doses of THC (2.5, 5 and 10 mg/kg) (see Fig 1), which likely prevented the

1 development of tolerance to the THC effect. In our hands, a normalization of the
2 number of SERT+ fibres to control values was found in the animals exposed to both
3 drugs.

4
5 There are several reports suggesting that acute administration of THC prevents some of
6 the neurotoxic effects of MDMA (Touriño et al., 2007, 2010; Parrot et al., 2007; Morley
7 et al., 2004). This idea comes from the assumption that THC and MDMA induce, when
8 administered acutely, in the short-term, opposite pharmacological effects on certain
9 parameters such as locomotion, thermal response and anxiety (Touriño et al., 2010).

10 Most of the studies about this topic have studied the acute effects and/or short-term
11 outcomes of THC+MDMA combination and in adult animals, whereas only a few
12 studies have used chronic treatments during the adolescent period, which is the temporal
13 window when these drugs are usually consumed by humans (EMCDDA, 2012) and
14 analysed the effects in the long term, after a relatively long wash out period (between 44
15 and 47 days after the end of the pharmacological treatment). In these latter conditions,
16 which mimic more adequately the usual human consumption pattern, the outcomes are
17 far more complex. We have previously found that adolescent co-administration of THC
18 and MDMA induced a stronger deterioration of working memory in females and
19 attentional capabilities in both sexes compared to the effect of each drug when
20 administered alone (Llorente-Berzal et al., 2013a). Other authors have reported that
21 THC may somehow counteract the anxiogenic-like effect of MDMA (Morley et al.,
22 2004; Shen et al., 2011), whereas we did not find any interaction of MDMA and THC in
23 the plus-maze (a test that is used to evaluate anxiety-related behaviour) (Llorente-Berzal
24 et al., 2013a). Thus, in our case, the normalization of SERT expression induced by the

1 combination of THC and MDMA does not appear to be reflected in “normalization” at
2 the behavioural level.

3
4 The present results show that SERT expression was higher in control females than in
5 control males. The serotonergic system presents sexual dimorphisms. Ortiz et al.
6 (1988) reported higher plasmatic levels of serotonin in women than in men and
7 Mitsushima et al. (2006) found that male rats have higher levels of serotonin than
8 females in the basolateral amygdala, possibly due to a higher synthesis rate in males in
9 several brain regions, including the parietal cortex (Nishizawa et al., 1997). Our results
10 show that control females show a higher density of SERT+ fibres in the parietal cortex,
11 supporting previous studies in humans (Staley et al., 2001).

12
13 Regarding cannabinoid CB1R expression results, we did not observe significant effects
14 of the pharmacological treatments in males, whereas in females a nice “staircase” effect
15 appeared, with the group exposed to both drugs showing the lowest CB1R expression.
16 This same profile was found for the discrimination index in the novel object test for
17 male and female animals, i.e. no effects in males and a decrease in females with the
18 highest decrease found in females treated with both THC and MDMA (Llorente-Berzal
19 et al., 2013a). This test is usually employed to assess hippocampal-related long-term
20 memory reconsolidation, and the discrimination index provides a measurement of the
21 animals’ ability to discriminate a novel object from a familiar one, which is known as
22 object recognition memory (ORM) (Antunes y Biala, 2012). Since it has been
23 previously shown that endocannabinoid system is crucial for ORM (Rubino and
24 Parolaro, 2011; Clarke et al., 2008), it is conceivable that the marked reduction of

hippocampal CB1 receptors in the female animals exposed to both drugs, THC and MDMA, is related to their impaired memory function (Llorente-Berzal et al., 2013a).

Previous studies with similar protocols have demonstrated long-term changes in CB1R density after a chronic CB1R agonist treatment during adolescence, showing a decrease in CB1 immunoreactivity in males (Rubino et al., 2008) and similar results were obtained with a treatment with CP-55,940 in adolescent rats (López-Gallardo et al., 2012). The discrepancy between these data and the ones found in the present study could be due to differences in the CB1R agonists, rats strain and/or previous manipulation i.e. the set of behavioural tests that the animals used in this case had performed (Llorente-Berzal et al., 2013a). We have already reported a basal sexual dimorphism in CB1R levels in the hippocampus, with females exhibiting lower levels of CB1R than males (Llorente-Berzal et al., 2013c; López-Gallardo et al., 2012; Mateos et al., 2011); however the results of the present study shows the opposite trend. CB1R expression can be altered by disturbances during neurodevelopmental periods (López-Gallardo et al., 2012; Suárez et al., 2009). In the present experiments, control animals were submitted to chronic injections of vehicle and saline, rectal temperature measurements and holeboard and elevated plus maze behavioural tests during adolescence (Llorente-Berzal et al., 2013a), which is a determinant neurodevelopmental period of the endocannabinoid system (Viveros et al., 2011). This could be a plausible explanation for the apparent discrepancy between the present results and previous studies.

To sum up, the present results show that THC and/or MDMA administration during adolescence induces long-term alterations in neuroinflammation related parameters and

1 changes in serotonergic and cannabinoid systems. The majority of the studies
2 focussed to clarify the effects of these two drugs do not represent the actual pattern of
3 human consumption. For this reason, animal models such as the one used in here, which
4 mimics more adequately the human situation could provide a truthful evidence for the
5 long-lasting effects of drugs. These results also point out that sex is a crucial factor.
6 There is evidence for the existence of sex differences in the metabolism of several
7 neurotransmitters such as dopamine, serotonin or GABA (Andreano and Cahill, 2009),
8 as well as various neuropeptidergic systems (Bielsky et al., 2005; Kauffman, 2010).
9 Therefore, it is plausible that compounds that interact with these systems such as
10 cannabinoids or psychostimulants, induce different responses in males and females.

11
12

13 **ACKNOWLEDGMENTS**

14 Supported by Plan Nacional sobre Drogas Orden SAS/1250/2009, GRUPOS UCM-
15 BSCH: 951579, Red de trastornos adictivos RD06/0001/1013 and RD12/0028/0021 and
16 Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (grant number BFU2011-30217-C03-
17 01).

18
19

1 LIST OF REFERENCES

- 2 Andreano JM, Cahill L (2009). Sex influences on the neurobiology of learning and
3 memory. *Learn Mem* 16(4): 248-266.
- 4 Antunes M, Biala G (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test
5 procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13(2):93-110.
- 6 Ashton J. C and Glass M (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for
7 inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 5 (2): 73-80.
- 8 Battaglia G, Sharkey J, Kuhar MJ, de Souza EB (1991). Neuroanatomic specificity and
9 time course of alterations in rat brain serotonergic pathways induced by MDMA (3,4-
10 methylenedioxymethamphetamine): assessment using quantitative autoradiography.
11 *Synapse* 8(4): 249-260.
- 12 Baumann MH, Wang X, Rothman RB (2007). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine
13 (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings.
14 *Psychopharmacology (Berl)* 189(4): 407-424.
- 15 Bielsky IF, Hu SB, Young LJ (2005). Sexual dimorphism in the vasopressin system:
16 lack of an altered behavioral phenotype in female V1a receptor knockout mice. *Behav*
17 *Brain Res* 164(1): 132-136.
- 18 Biezonski DK, Meyer JS (2011). The Nature of 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine
19 (MDMA)-Induced Serotonergic Dysfunction: Evidence for and Against the
20 Neurodegeneration Hypothesis. *Curr Neuropharmacol* 9(1):84-90.
- 21 Biscaia M, Marin S, Fernandez B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, et al. (2003). Chronic
22 treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the
23 behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology*
24 *(Berl)* 170(3): 301-308.

- 1 Bossong M, Niesink R (2010). Adolescent brain maturation, the endogenous
2 cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Prog*
3 *Neurobiol.* 92(3): 370-385-
- 4 Bubeníková V, Votava M, Horáček J, Páleníček T (2005). Relation of sex and estrous
5 phase to deficits in prepulse inhibition of the startle response induced by ecstasy
6 (MDMA). *Behav Pharmacol* 16(2): 127-130.
- 7 Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP (2004). Sex and estrogen
8 influence drug abuse. *Trends Pharmacol Sci* 25(5): 273-279.
- 9 Childers SR (2006). Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous
10 cannabinoids. *AAPS J* 8(1):E112-E117.
- 11 Clarke JR, Rossato JJ, Monteiro S, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Cammarota M (2008).
12 Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal
13 hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*
14 90(2): 374-381.
- 15 Connor TJ, Harkin A, Kelly JP (2005). Methylenedioxymethamphetamine suppresses
16 production of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α independent of
17 a beta-adrenoceptor-mediated increase in interleukin-10. *J Pharmacol Exp Ther* 312(1):
18 134-143.
- 19 Craft RM, Marusich JA, Wiley JL (2013). Sex differences in cannabinoid
20 pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life Sci.*
21 92(8-9):476-81.
- 22 Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Garcia-Segura LM (2012). Prenatal stress causes
23 alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the
24 hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation* 9: 71.

- 1 EMCDDA (2012). Annual report 2012: the state of the drug problem in Europe. edn.
2 European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- 3 Fonsart J, Menet MC, Debray M, Hirt D, Noble F, Scherrmann JM, et al. (2009).
4 Sprague-Dawley rats display sex-linked differences in the pharmacokinetics of 3,4-
5 methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its metabolite 3,4-
6 methylenedioxyamphetamine (MDA). *Toxicol Appl Pharmacol* 241(3):339-347.
- 7 Frau L, Simola N, Plumitallo A, Morelli M (2013). Microglial and astroglial activation
8 by 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in mice depends on S(+)
9 enantiomer and is associated with an increase in body temperature and motility. *J*
10 *Neurochem* 124(1): 69-78.
- 11 Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988). Interleukin-1
12 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J*
13 *Neurosci* 8(7): 2485-2490.
- 14 Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, et al.
15 (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a
16 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8(1): 65-72.
- 17 Haj-Dahmane S, Shen RY (2011). Modulation of the serotonin system by
18 endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* 61(3): 414-420.
- 19 Hansson SR, Cabrera-Vera TM, Hoffman BJ (1998). Infraorbital nerve transection
20 alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat
21 development. *Brain Res Dev Brain Res* 111(2): 305-14.
- 22 Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, et al.
23 (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932-
24 1936.

- 1 Johnson EA, Shvedova AA, Kisin E, O'Callaghan JP, Kommineni C, Miller DB (2002).
2 d-MDMA during vitamin E deficiency: effects on dopaminergic neurotoxicity and
3 hepatotoxicity. *Brain Res* 933(2): 150-163.
- 4 Kauffman AS (2010). Gonadal and nongonadal regulation of sex differences in
5 hypothalamic Kiss1 neurones. *J Neuroendocrinol* 22(7): 682-691.
- 6 Keimpema E, Mackie K, Harkany T (2011). Molecular model of cannabis sensitivity in
7 developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci* 32(9):551-561.
- 8 Klein C, Karanges E, Spiro A, Wong A, Spencer J, Huynh T, et al. (2011). Cannabidiol
9 potentiates Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC
10 pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats.
11 *Psychopharmacology (Berl)* 218(2): 443-457.
- 12 Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, et al. (2007). Early
13 maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist
14 induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats.
15 *Psychoneuroendocrinology* 32(6): 636-650.
- 16 Llorente-Berzal A, Assis MA, Rubino T, Zamberletti E, Marco EM, Parolaro D, et al.
17 (2013c). Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and
18 immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent
19 cocaine exposure. *Pharmacol Res* 74:23-33.
- 20 Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, Lopez-Gallardo M, Armario A, Viveros MP,
21 et al. (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid
22 treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16(4): 624-637.
- 23 Llorente-Berzal A, Manzanedo C, Daza-Losada M, Valero M, López-Gallardo M,
24 Aguilar MA, et al. (2013b). Sex-dependent effects of early maternal deprivation on

- 1 MDMA-induced conditioned place preference in adolescent rats: Possible
2 neurochemical correlates. *Toxicology* 311(1-2):78-86.
- 3 Llorente-Berzal A, Puighermanal E, Burokas A, Ozaita A, Maldonado R, Marco E, et
4 al. (2013a). Sex dependent behavioural and molecular effects of THC and MDMA in an
5 animal model of adolescent drug consumption. *Plos One*. Accepted
- 6 López-Gallardo M, López-Rodríguez AB, Llorente-Berzal Á, Rotllant D, Mackie K,
7 Armario A, et al. (2012). Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure
8 impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in
9 a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience* 204: 90-103.
- 10 Marchalant Y, Rosi S, Wenk GL (2007). Anti-inflammatory property of the
11 cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation.
12 *Neuroscience* 144(4): 1516-1522.
- 13 Marco EM, Romero-Zerbo SY, Viveros MP, Bermudez-Silva FJ (2012). The role of the
14 endocannabinoid system in eating disorders: pharmacological implications. *Behav*
15 *Pharmacol* 23(5-6): 526-536
- 16 Massi P, Valenti M, Bolognini D, Parolaro D (2008). Expression and function of the
17 endocannabinoid system in glial cells. *Curr Pharm Des* 14(23): 2289-2298.
- 18 Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, Llorente R, et al. (2011). Adolescent
19 exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-
20 dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB(1)
21 cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol* 25(12): 1676-1690.
- 22 Meyer JS, Piper BJ, Vancollie VE (2008). Development and characterization of a novel
23 animal model of intermittent MDMA ("Ecstasy") exposure during adolescence. *Ann N*
24 *Y Acad Sci* 1139: 151-163.

- 1 Mitsushima D, Yamada K, Takase K, Funabashi T, Kimura F (2006). Sex differences in
2 the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their
3 responses to restraint stress in rats. *Eur J Neurosci* 24(11): 3245-3254.
- 4 Monks TJ, Jones DC, Bai F, Lau SS (2004). The role of metabolism in 3,4-(+)-
5 methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)
6 toxicity. *Ther Drug Monit* 26(2): 132-136.
- 7 Moreira FA, Lutz B (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and
8 addiction. *Addict Biol* 13:196-212.
- 9 Morley KC, Li KM, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS (2004). Cannabinoids prevent
10 the acute hyperthermia and partially protect against the 5-HT depleting effects of
11 MDMA ("Ecstasy") in rats. *Neuropharmacology* 46(7): 954-965.
- 12 Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN, Leyton M, Mzengeza S, de Montigny C, et al.
13 (1997). Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human
14 brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5308-5313.
- 15 O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006). Repeated cannabinoid exposure during
16 perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object
17 recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20(5): 611-621.
- 18 O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004). Chronic cannabinoid exposure
19 produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult
20 rats. *J Psychopharmacol* 18(4): 502-508.
- 21 Orio L, O'Shea E, Sanchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, et al. (2004). 3,4-
22 Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates
23 microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT
24 depletion. *J Neurochem* 89(6): 1445-1453.

- 1 Ortiz J, Artigas F, Gelpí E (1988). Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 43(12):
2 983-990.
- 3 Palenicek T, Votava M, Bubenikova V, Horacek J (2005). Increased sensitivity to the
4 acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol Behav* 86(4): 546-553.
- 5 Parrott AC (2004). MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) or ecstasy: the
6 neuropsychobiological implications of taking it at dances and raves.
7 *Neuropsychobiology* 50(4): 329-335.
- 8 Parrott AC, Milani RM, Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2007). Cannabis and
9 Ecstasy/MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): an analysis of their
10 neuropsychobiological interactions in recreational users. *J Neural Transm* 114(8): 959-
11 968.
- 12 Paxinos G, Watson C (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. edn.
13 Elsevier: New York.
- 14 Piper BJ (2007). A developmental comparison of the neurobehavioral effects of ecstasy
15 (MDMA). *Neurotoxicol Teratol* 29(2): 288-300.
- 16 Quednow BB, Jessen F, Kuhn KU, Maier W, Daum I, Wagner M (2006) Memory
17 deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal
18 dysfunction. *J Psychopharmacol* 20(3):373-384.
- 19 Quednow BB, Kühn KU, Hoppe C, Westheide J, Maier W, Daum I, et al. (2007).
20 Elevated impulsivity and impaired decision-making cognition in heavy users of MDMA
21 ("Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)* 189(4):517-530.
- 22 Quesseveur G, Gardier AM, Guiard BP (2013). The monoaminergic tripartite synapse: a
23 putative target for currently available antidepressant drugs. *Curr Drug Targets*
24 14(11):1277-94.

- 1 Ramaekers JG, Theunissen EL, de Brouwer M, Toennes SW, Moeller MR, Kauert G
2 (2011). Tolerance and cross-tolerance to neurocognitive effects of THC and alcohol in
3 heavy cannabis users. *Psychopharmacology (Berl)* 214(2):391-401.
- 4 Ros-Simó C, Moscoso-Castro M, Ruiz-Medina J, Ros J, Valverde O (2013). Memory
5 impairment and hippocampus specific protein oxidation induced by ethanol intake and
6 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice. *J Neurochem* 125(5):736-
7 746.
- 8 Rubino T, Vigano D, Realini N, Guidali C, Braidà D, Capurro V, et al. (2008). Chronic
9 delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the
10 emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates.
11 *Neuropsychopharmacology* 33(11): 2760-2771.
- 12 Rubino T, Parolaro D (2011). Sexually dimorphic effects of cannabinoid compounds on
13 emotion and cognition. *Front Behav Neurosci* 5: 64.
- 14 Schmued LC (2003). Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat
15 forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res* 974(1-2): 127-133.
- 16 Schneider M, Koch M (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid
17 treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a
18 progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28(10): 1760-1769.
- 19 Schneider M, Koch M (2007). The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment
20 on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur*
21 *Neuropsychopharmacol* 17(3): 180-186.
- 22 Schulz S (2011). MDMA & cannabis: a mini-review of cognitive, behavioral, and
23 neurobiological effects of co-consumption. *Curr Drug Abuse Rev* 4(2): 81-86.
- 24 Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD (2012). Sex differences in microglial colonization of
25 the developing rat brain. *J Neurochem* 120(6): 948-963.

- 1 Shen EY, Ali SF, Meyer JS (2011). Chronic administration of THC prevents the
2 behavioral effects of intermittent adolescent MDMA administration and attenuates
3 MDMA-induced hyperthermia and neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 61(8):
4 1183-1192.
- 5 Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, et al. (1996). In
6 vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1
7 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17(5): 761-766.
- 8 Shivers SC, Newton C, Friedman H, Klein TW (1994). delta 9-Tetrahydrocannabinol
9 (THC) modulates IL-1 bioactivity in human monocyte/macrophage cell lines. *Life Sci*
10 54(17): 1281-1289.
- 11 Spear L (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.
12 *Neurosci Biobehav Rev* 24(4): 417-463.
- 13 Staley JK, Krishnan-Sarin S, Zoghbi S, Tamagnan G, Fujita M, Seibyl JP, et al. (2001).
14 Sex differences in [¹²³I]beta-CIT SPECT measures of dopamine and serotonin
15 transporter availability in healthy smokers and nonsmokers. *Synapse* 41(4): 275-284.
- 16 Stella N (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes,
17 and astrocytomas. *Glia* 58(9): 1017-1030.
- 18 Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR,
19 et al. (2009). Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the
20 expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats.
21 *Hippocampus* 19(7): 623-632.
- 22 Sullivan JM (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and
23 memory impairments produced by cannabinoids. *Learn Mem* 7:132-139.
- 24 Touriño C, Maldonado R, Valverde O (2007). MDMA attenuates THC withdrawal
25 syndrome in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 193(1): 75-84.

- 1 Touriño C, Zimmer A, Valverde O (2010). THC Prevents MDMA Neurotoxicity in
2 Mice. PLoS One 5(2): e9143.
- 3 Viveros M, Llorente R, López-Gallardo M, Suarez J, Bermúdez-Silva F, De la Fuente
4 M, et al. (2009). Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats.
5 Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1: S217-226.
- 6 Viveros M, Marco E, File S (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety
7 responses. Pharmacol Biochem Behav 81(2): 331-342.
- 8 Viveros MP, Llorente R, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, de Fonseca
9 FR (2012). The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex
10 differences and neuropsychiatric implications. J Psychopharmacol 26(1): 164-176.
- 11 Viveros MP, Marco EM, File SE (2006). Nicotine and cannabinoids: parallels, contrasts
12 and interactions. Neurosci Biobehav Rev 30(8): 1161-1181.
- 13 Viveros MP, Marco EM, Llorente R, Lamota L (2007). The role of the hippocampus in
14 mediating emotional responses to nicotine and cannabinoids: a possible neural substrate
15 for functional interactions. Behav Pharmacol 18(5-6): 375-389.
- 16 Viveros MP, Marco EM, López-Gallardo M, Garcia-Segura LM, Wagner EJ (2011).
17 Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids.
18 Neurosci Biobehav Rev 35(8): 1740-1751.
- 19 Walker QD, Williams CN, Jotwani RP, Waller ST, Francis R, Kuhn CM (2007). Sex
20 differences in the neurochemical and functional effects of MDMA in Sprague-Dawley
21 rats. Psychopharmacology (Berl) 189(4): 435-445.
- 22 Weibel ER (1979). Stereological methods. I. Practical methods for biological
23 morphometry. Academic Press, London.

- 1 Wish ED, Fitzelle DB, O'Grady KE, Hsu MH, Arria AM (2006). Evidence for
2 significant polydrug use among ecstasy-using college students. *J Am Coll Health* 55(2):
3 99-104.
- 4 Wolf SA, Tauber S, Ullrich O (2008). CNS immune surveillance and
5 neuroinflammation: endocannabinoids keep control. *Curr Pharm Des* 14(23): 2266-
6 2278.
- 7 Zamberletti E, Prini P, Speziali S, Gabaglio M, Solinas M, Parolaro D, et al. (2012).
8 Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-
9 tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience* 204: 245-257.

10

11

1 **FIGURE LEGENDS**

2 Figure 1. Scheme of the pharmacological treatment. Animals were exposed to
3 increasing doses of THC 2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle, i.p.) from pnd 28 to 45, and to
4 MDMA (10 mg/kg or saline, s.c.) twice a day every 5 days from pnd 30 to 45 with an
5 inter-dose interval of 4 h.

6

7 Figure 2. Percentage of area occupied by GFAP positive cells in the hilus of adult male
8 and female rats. Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10
9 mg/kg or vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)]
10 twice a day every 5 days from pnd 30 to 45. Representative images of GFAP
11 immunoreactivity in the hilus. (A), Vh-Sal Male; (B), THC-Sal Male; (C), THC-
12 MDMA Male; (D), Vh-Sal Female; (E), THC-Sal Female. Scale bar of the inserts,
13 100µm. (F), Histogram representing the mean + SEM (n=4-6) of the percentage of area
14 occupied by GFAP positive cells. Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$: * vs. Male Vh-Sal;
15 \$ vs. Female Vh-Sal.

16

17 Figure 3. Percentage of reactive microglial cells in the hilus of adult male and female
18 rats. Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle
19 (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day every 5
20 days from pnd 30 to 45. Representative images of Iba-1 immunoreactivity in the hilus.
21 (A), Vh-Sal Male; (B), Vh-MDMA Male; (C), THC-Sal Male; (D), THC-MDMA Male;
22 (E), Vh-Sal Female; (F), Vh-MDMA Female; (G), THC-Sal Female; (H), THC-MDMA
23 Female. Scale bar of the inserts, 50µm. (I), Histogram representing the mean + SEM
24 (n=4-6) of the percentage of reactive microglial cells. Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$:
25 * vs. Male Vh-Sal; \$ vs. Female Vh-Sal; Ø vs. Female Vh-MDMA; + vs. Females

1 THC-Sal. (J) Microglia cells stained with Iba-1 and classified according to
2 morphological aspects (Diz-Chaves et al., 2012). Highlighted, reactive phenotype (from
3 type III to V).

4
5 Figure 4. Surface density of SERT positive fibres in the parietal cortex of adult male
6 and female rats, assessed using a morphometric grid according to the method of Weibel
7 (1979). Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or
8 vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day
9 every 5 days from pnd 30 to 45. Representative images of SERT immunoreactivity in
10 the parietal cortex. (A), Vh-Sal Male; (B), Vh-MDMA Male; (C), THC-Sal Male; (D),
11 THC-MDMA Male; (E), Vh-Sal Female; (F), Vh-MDMA Female; (G), THC-MDMA
12 Female; (H), Histogram representing the mean + SEM (n=4-6) of the surface density of
13 SERT positive fibres. Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$: * vs. Male Vh-Sal; # vs. Male
14 Vh-MDMA; & vs. Male THC-Sal; \$ vs. Female Vh-Sal; Ø vs. Female Vh-MDMA; +
15 vs. Females THC-Sal.

16
17 Figure 5. Optic densitometry of CB1 receptor expression in three hippocampal areas,
18 i.e. CA1, CA3 and hilus, of adult male and female rats. Animals were exposed to
19 increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and
20 to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day every 5 days from pnd 30 to 45.
21 Representative images of CB1 immunoreactivity in CA1, CA3 and hilus. (B), CA1 Vh-
22 Sal Female; (C), CA1 THC-MDMA Female; (E), CA3 Vh-Sal Female; (F), CA3 THC-
23 MDMA Female; (H), Hilus Vh-Sal Female; (I), Hilus THC-MDMA Female.
24 Histograms representing the mean + SEM (n=4-6) of optic densitometry of CB1

1 receptor expression of CA1 (A), CA3 (D) and hilus (G) areas of the hippocampus.

2 Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$: \$ vs. Female Vh-Sal.

3

4 **STATEMENT OF CONFLICT OF INTEREST**

5

6 None.

For Peer Review

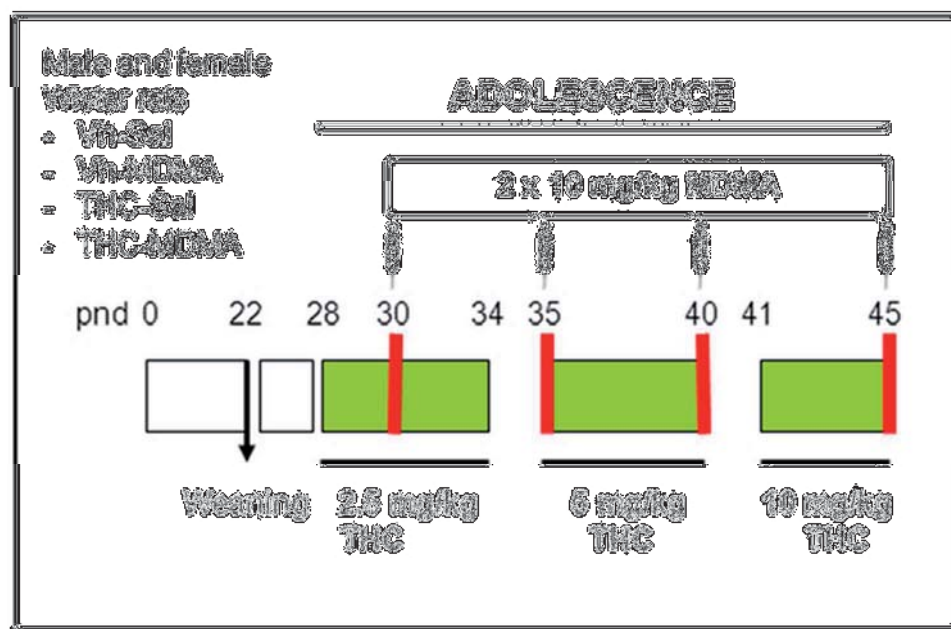


Figure 1. Scheme of the pharmacological treatment. Animals were exposed to increasing doses of THC 2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle, i.p.) from pnd 28 to 45, and to MDMA (10 mg/kg or saline, s.c.) twice a day every 5 days from pnd 30 to 45 with an inter-dose interval of 4 h.
52x34mm (300 x 300 DPI)

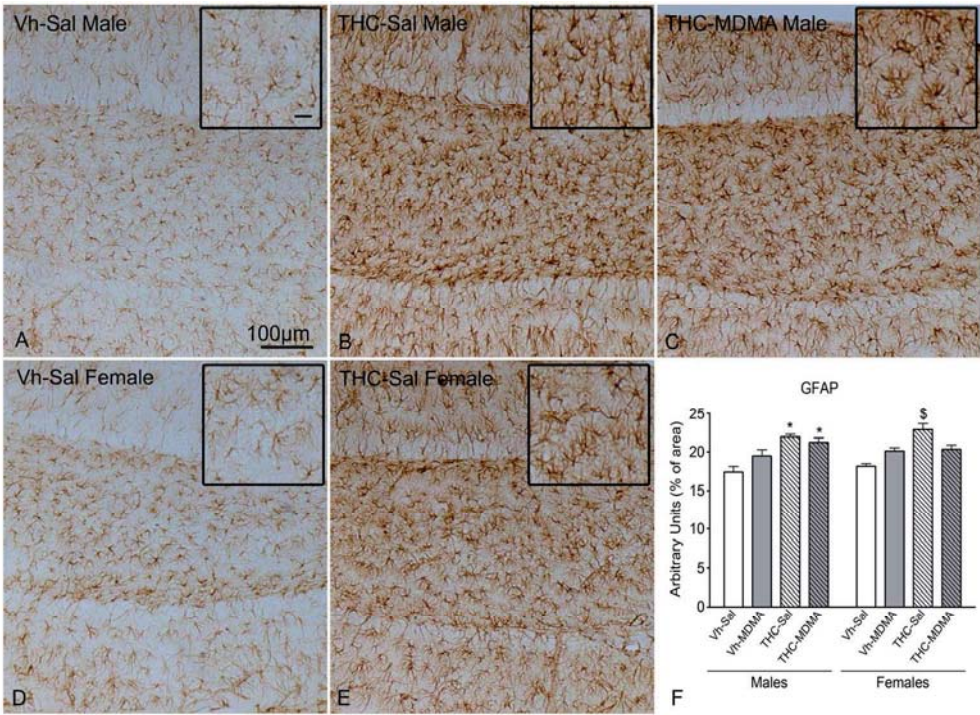


Figure 2. Percentage of area occupied by GFAP positive cells in the hilus of adult male and female rats. Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day every 5 days from pnd 30 to 45. Representative images of GFAP immunoreactivity in the hilus. (A), Vh-Sal Male; (B), THC-Sal Male; (C), THC-MDMA Male; (D), Vh-Sal Female; (E), THC-Sal Female. Scale bar of the inserts, 100µm. (F), Histogram representing the mean + SEM (n=4-6) of the percentage of area occupied by GFAP positive cells. Bonferroni post hoc test, $p<0.05$: * vs. Male Vh-Sal; \$ vs. Female Vh-Sal.

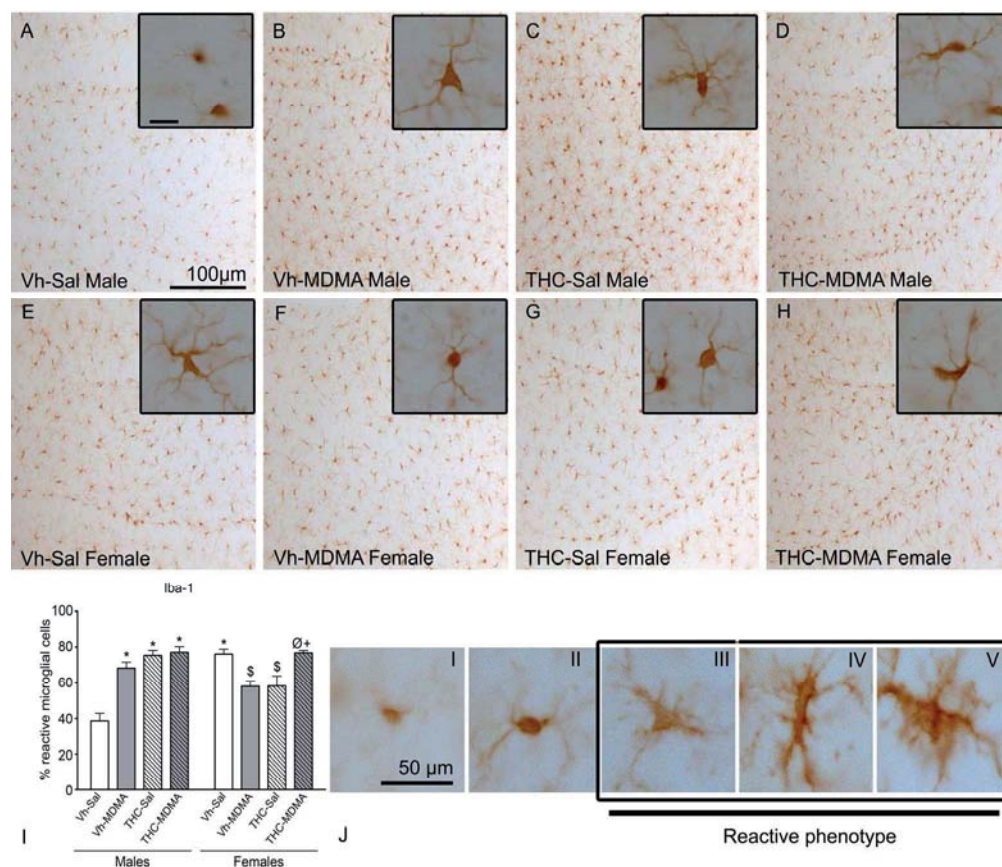


Figure 3. Percentage of reactive microglial cells in the hilus of adult male and female rats. Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day every 5 days from pnd 30 to 45. Representative images of Iba-1 immunoreactivity in the hilus. (A), Vh-Sal Male; (B), Vh-MDMA Male; (C), THC-Sal Male; (D), THC-MDMA Male; (E), Vh-Sal Female; (F), Vh-MDMA Female; (G), THC-Sal Female; (H), THC-MDMA Female. Scale bar of the inserts, 50µm. (I), Histogram representing the mean + SEM (n=4-6) of the percentage of reactive microglial cells. Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$: * vs. Male Vh-Sal; \$ vs. Female Vh-Sal; Ø vs. Female Vh-MDMA; + vs. Females THC-Sal. (J) Microglia cells stained with Iba-1 and classified according to morphological aspects (Diz-Chaves et al., 2012). Highlighted, reactive phenotype (from type III to V). 154x133mm (300 x 300 DPI)

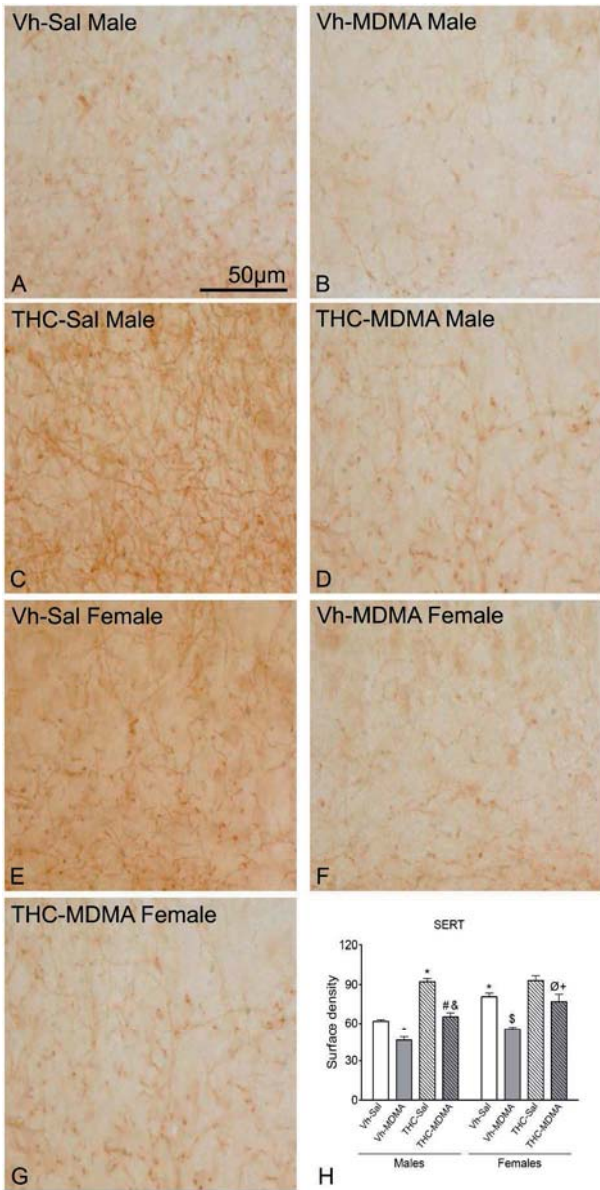


Figure 4. Surface density of SERT positive fibres in the parietal cortex of adult male and female rats, assessed using a morphometric grid according to the method of Weibel (1979). Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day every 5 days from pnd 30 to 45. Representative images of SERT immunoreactivity in the parietal cortex. (A), Vh-Sal Male; (B), Vh-MDMA Male; (C), THC-Sal Male; (D), THC-MDMA Male; (E), Vh-Sal Female; (F), Vh-MDMA Female; (G), THC-MDMA Female; (H), Histogram representing the mean + SEM (n=4-6) of the surface density of SERT positive fibres. Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$: * vs. Male Vh-Sal; # vs. Male Vh-MDMA; & vs. Male THC-Sal; \$ vs. Female Vh-Sal; Ø vs. Female Vh-MDMA; + vs. Females THC-Sal.

184x367mm (300 x 300 DPI)

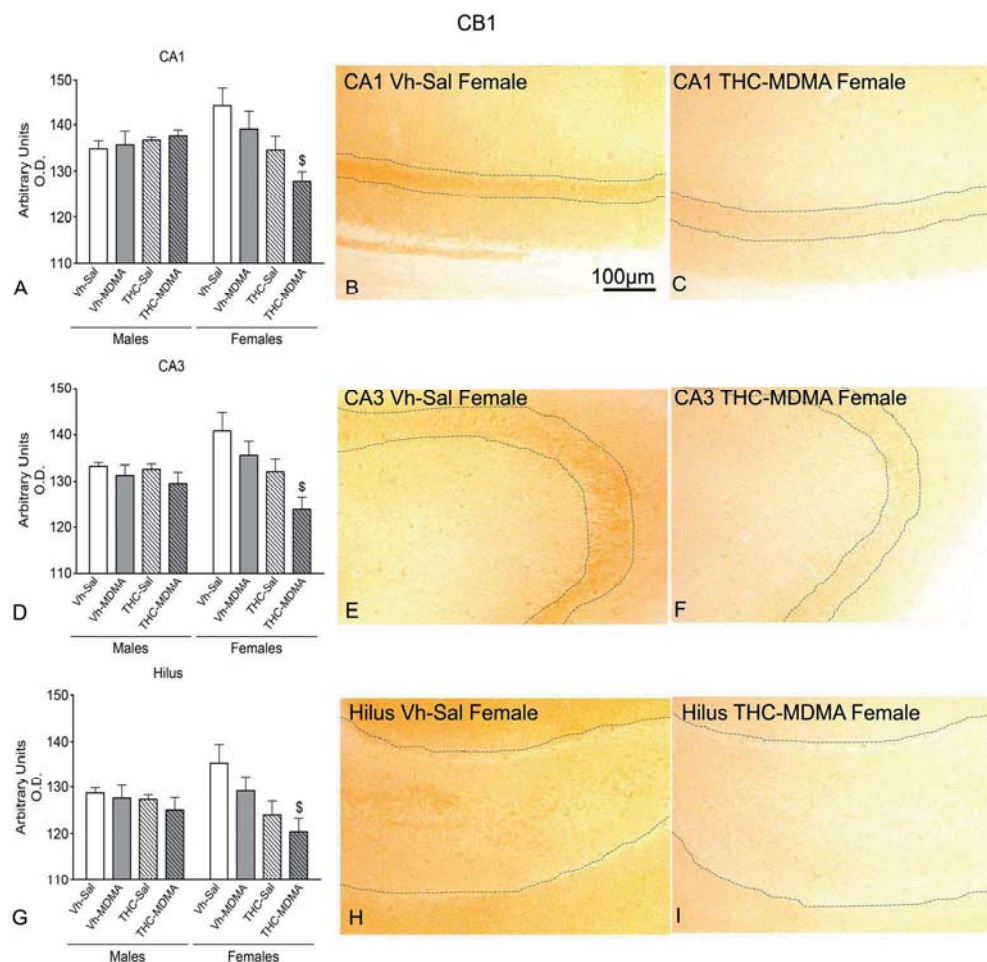


Figure 5. Optic densitometry of CB1 receptor expression in three hippocampal areas, i.e. CA1, CA3 and hilus, of adult male and female rats. Animals were exposed to increasing doses of THC [2.5, 5 and 10 mg/kg or vehicle (Vh)] from pnd 28 to 45, and to MDMA [10 mg/kg or saline (Sal)] twice a day every 5 days from pnd 30 to 45. Representative images of CB1 immunoreactivity in CA1, CA3 and hilus. (B), CA1 Vh-Sal Female; (C), CA1 THC-MDMA Female; (E), CA3 Vh-Sal Female; (F), CA3 THC-MDMA Female; (H), Hilus Vh-Sal Female; (I), Hilus THC-MDMA Female. Histograms representing the mean + SEM (n=4-6) of optic densitometry of CB1 receptor expression of CA1 (A), CA3 (D) and hilus (G) areas of the hippocampus. Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$: \$ vs. Female Vh-Sal.

165x160mm (300 x 300 DPI)

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

A pesar de que el cannabis y el éxtasis son drogas de abuso consumidas en un alto porcentaje por adolescentes, todavía no se conocen claramente los efectos de su consumo combinado, particularmente, se sabe poco sobre el impacto psiconeuroendocrino de tal combinación a largo plazo y, que nosotros sepamos, este es el primer estudio que analiza directamente diferencias sexuales a este respecto.

Tal como esperábamos, el tratamiento con MDMA causó, en ambos sexos, un incremento significativo de la temperatura corporal tras su administración. En las hembras, la administración de THC a DP 30 revirtió parcialmente la hipertermia inducida por la MDMA, efecto que no se encontró en los machos. A DP 45 el tratamiento con THC no alteró las propiedades hiperpiréticas de la MDMA en ninguno de los dos sexos.

Un día después del final del tratamiento farmacológico, en el TCA, los animales tratados con THC mostraron una disminución del tiempo que pasaban en el interior del aparato. Por otro lado, en esta misma prueba, la exposición previa a MDMA produjo una disminución de la frecuencia y duración de la conducta exploratoria, mientras que en el LCE causó un aumento significativo del tiempo en los brazos abiertos del aparato, especialmente entre las hembras, lo que ha sido clásicamente relacionado con una reducción de la ansiedad. Sin embargo, a este respecto merece la pena destacar que los animales tratados con MDMA mostraron un índice de caídas del LCE superior a las ratas tratadas con salino por lo que podríamos especular sobre la posibilidad de que lo que realmente ha provocado el presente modelo de consumo de MDMA de fin de semana sobre estos animales sea un incremento del comportamiento de toma de riesgos.

En el campo abierto, observamos que las hembras presentaron unos mayores índices de actividad locomotora (tanto horizontal como vertical) que los machos. El tratamiento durante la adolescencia con THC causó en los animales adultos de ambos sexos una disminución del tiempo de exploración del interior del aparato, indicativo de un aumento de emocionalidad/ansiedad. La MDMA produjo un efecto similar que sólo fue evidente entre los animales tratados con vehículo, seguramente debido a los ya de

por sí bajos niveles de exploración del interior del campo abierto inducidos por el THC. En el NOT se observó una grave alteración de la función cognitiva debida al tratamiento adolescente con THC en las hembras, pero no en los machos. La exposición a MDMA, por su parte, causó una disminución de la conducta de exploración de los objetos en el NOT así como una alteración de la PPI a la mayor intensidad prepulso estudiada (80 dB), aunque la combinación con el tratamiento con THC produjo también una disminución del porcentaje de PPI a 75 dB. También observamos unos mayores niveles de PPI en los machos que en las hembras, lo que podría indicar diferencias sexuales en el filtrado sensomotor.

Como cabía esperar, la ganancia de peso corporal fue mayor en los machos que en las hembras. Los animales tratados con MDMA mostraron una menor tasa de ganancia de peso corporal a lo largo de todo el tratamiento farmacológico. La administración de THC durante la adolescencia también provocó una disminución del crecimiento en las ratas de ambos sexos, pero este efecto apareció antes en las hembras que en los machos. Los animales de ambos sexos expuestos durante su adolescencia a ambas drogas, THC y MDMA, mostraron la menor tasa de ganancia de peso corporal. A largo plazo, todavía podían observarse los efectos de ambos tratamientos sobre la ganancia de peso corporal, aunque de una manera más significativa en los machos que en las hembras.

El tratamiento adolescente con THC produjo una disminución significativa de la expresión de Arc en el córtex prefrontal de hembras adultas, pero no en el de machos, mientras que en el hipocampo esta reducción fue independiente del sexo. La MDMA, por su parte, causó una reducción de la inmunorreactividad de Arc exclusivamente en el hipocampo de hembras tratadas con THC, pero no en las tratadas con vehículo. En cuanto a las pERK, el tratamiento durante la adolescencia con MDMA causó una disminución significativa de su inmunorreactividad en el córtex prefrontal de machos adultos. Sin embargo, ninguno de los dos tratamientos alteró a largo plazo la expresión de pERK en el córtex prefrontal de hembras ni en el hipocampo de ninguno de los dos sexos.

Las ratas macho tratadas sólo con THC (no expuestas a MDMA) mostraron a largo plazo una disminución de los niveles hipotalámicos de ARNm para la prepro-

orexina. En las hembras ninguno de los dos tratamientos farmacológicos produjo ninguna alteración sobre este parámetro.

A nivel hormonal, el tratamiento con THC produjo a DP 50 una disminución de los niveles circulantes de leptina en hembras, pero no en machos, mientras que la exposición a MDMA produjo una disminución de la corticosterona circulante en machos a largo plazo. En cuanto a diferencias sexuales en los animales controles, encontramos una diferencia sexual en los niveles plasmáticos de leptina en animales adultos (DP 90), exhibiendo los machos unos mayores niveles circulantes de esta hormona que las hembras, mientras que hembras exhibieron una mayor concentración de esta hormona que los machos a las dos edades estudiadas.

El estudio inmunohistoquímico del GFAP hipocampal mostró que el THC indujo un aumento significativo del porcentaje de área inmunorreactiva para GFAP tanto en machos como en hembras. Sin embargo, en las hembras este efecto tendió a verse contrarrestado por el tratamiento con MDMA.

En el análisis del número de células microgliales reactivas del hipocampo teñidas con Iba-1, encontramos una diferencia sexual en los animales controles, mostrando las hembras un mayor número de microglía con un fenotipo reactivo. En cuanto a los efectos de los tratamientos, en los machos la administración en período adolescente con THC y/o MDMA causó un aumento significativo del número de células microgliales reactivas en la edad adulta. Sin embargo, en las hembras, tanto el THC como la MDMA produjeron una disminución significativa de la microglía activada, mientras que la combinación de ambos tratamientos produjo una reversión hasta alcanzar niveles similares a las de las hembras control.

En lo referente al sistema serotoninérgico, las hembras control mostraron un mayor número de fibras SERT+ en la corteza parietal que los machos control. La MDMA produjo *per se* una disminución significativa de la expresión de SERT en machos y en hembras, mientras que el THC causó un aumento de este parámetro exclusivamente entre los machos. En ambos sexos, la combinación de ambos tratamientos, produjo una normalización de la inmunoreactividad al SERT hasta alcanzar valores similares a los de sus respectivos grupos control.

El análisis de la expresión del receptor CB1 en el hipocampo se realizó en las áreas CA1 y CA3 y en giro dentado (GD). En machos, ninguno de los tratamientos farmacológicos produjo ningún efecto significativo, mientras que en hembras el tratamiento con THC indujo una disminución significativa de la densidad de este receptor, siendo este efecto más acentuado cuando, además de con THC, el animal era tratado con MDMA. Asimismo, observamos un dimorfismo sexual en los controles, mostrando las hembras una mayor inmunorreactividad para el receptor CB1 hipocampal que los machos.

En su conjunto, los presentes resultados demuestran que la exposición durante la adolescencia a THC y/o MDMA produce diversos efectos sexo-dependientes a largo plazo a nivel conductual y neuroendocrino así como sobre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide y sobre marcadores relacionados con la neuroinflamación. El modelo animal empleado en este estudio, que mimetiza los patrones de consumo de estas drogas en la población adolescente resulta especialmente adecuado para analizar de una manera más fidedigna el impacto duradero de su consumo sobre la psicofisiología del individuo.

BLOQUE III

Estudio de la actividad del sistema endocannabinoide en un modelo animal de miedo extremo

Desde su primera descripción por parte de Marsicano *et al.* (2002), se ha publicado un gran número de artículos que confirman la participación de los receptores CB1 en la regulación del miedo [ver para revisión Riebe *et al.* (2012)]. A día de hoy tenemos constancia por ejemplo de que los receptores CB1 sobre terminales glutamatérgicos (Kamprath *et al.*, 2009) y sobre neuronas con presencia de receptores de dopamina tipo D1 (Terzian *et al.*, 2011) ejercen efectos opuestos a los receptores CB1 expresados en neuronas GABAérgicas (Metna-Laurent *et al.*, 2012). Es más, existen evidencias también de la participación de los receptores CB2 (Tambaro y Bortolato, 2012) y del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1, del inglés *Transient receptor potential vanilloid 1*; Moreira *et al.*, 2012) en el control de los estados de ánimo negativos.

Actualmente, existen un gran número de estudios que han relacionado el grado de aversión de un test conductual con la regulación del miedo y de la ansiedad producida por el sistema endocannabinoide (SEC; Marsch *et al.*, 2007; Naidu *et al.*, 2007; Haller *et al.*, 2004). Por ejemplo, en el trabajo de Kamprath *et al.* (2009) expusieron a ratones mutantes con una delección del receptor CB1 a diferentes intensidades de *shock* [0, 0,25, 0,7 y 1,5 mA; estímulo incondicionado (EI)] acompañado de un tono [estímulo condicionado (EC)]. Al día siguiente les expusieron a un contexto neutro acompañado del EC y midieron la respuesta de miedo. Observaron que aquellos animales que no expresaban el receptor CB1 exhibían una respuesta de miedo mayor que los animales “salvajes” o *wild-type*, pero sólo cuando los animales habían recibido una intensidad de *shock* eléctrico de 0,7 y 1,5 mA durante el condicionamiento, mientras que no se observaron diferencias significativas con intensidades de *shock* menores. Esto sugiere que los efectos aliviadores del miedo provocados por la activación de los receptores CB1 podrían producirse sólo en situaciones altamente estresantes. Por otro lado, Plendl y Wotjak (2010) demostraron que la exposición continuada al EC, i.e. un estímulo sonoro, durante las fases de

extinción produce una respuesta de *freezing* sostenida, es decir, que no decae a lo largo del tiempo. Con ambos trabajos en mente, decidimos caracterizar un modelo en el que se produjera una activación del SEC (mediante el condicionamiento de los animales con un *shock* eléctrico de 1,5 mA) y se produjera una respuesta de *freezing* estable a lo largo del tiempo (mediante la exposición de los animales a un tono continuo durante las fases de extinción) para poder testar tanto en agudo como de manera repetida, durante los tres primeros días tras el condicionamiento, a los animales con diversos moduladores de la actividad del SEC.

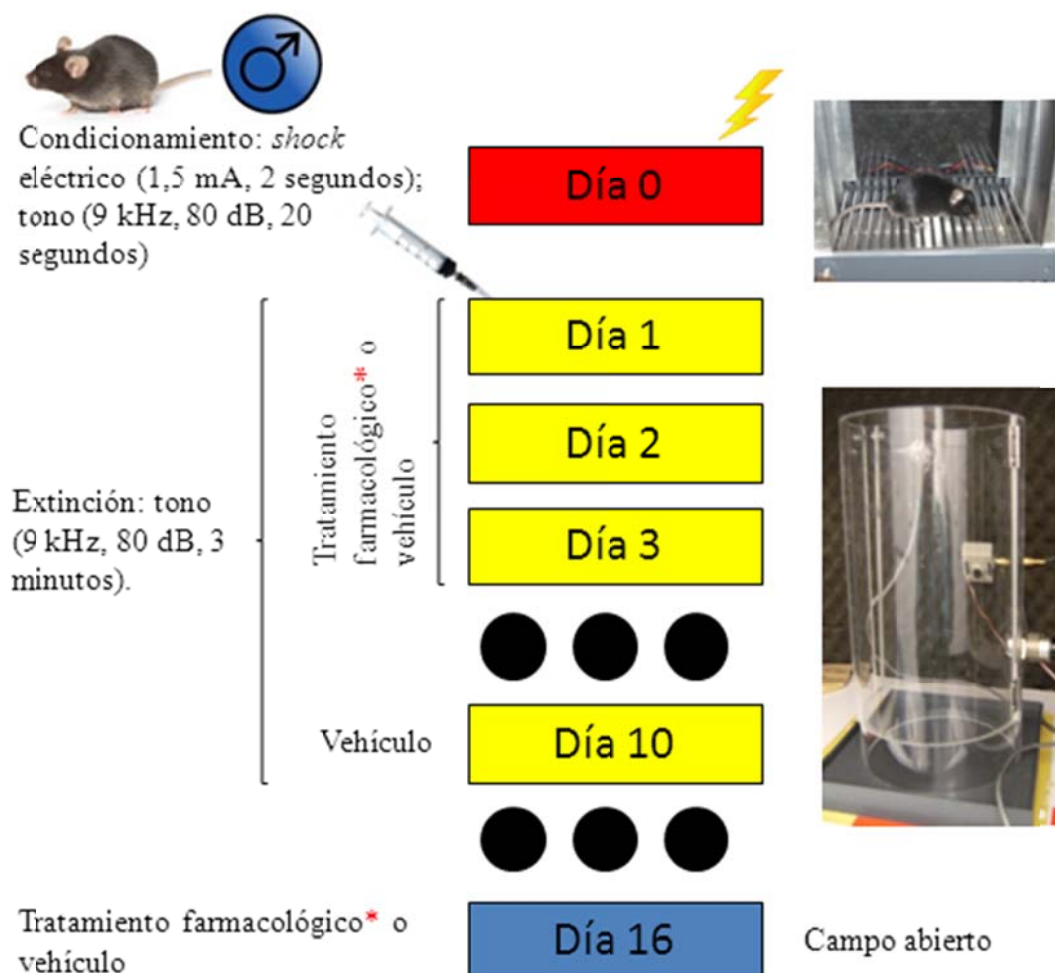
La anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) son los dos ligandos cannabinoides mejor conocidos del organismo, y ambos son sintetizados en regiones postsinápticas (como por ejemplo las espinas dendríticas) actuando, como mensajeros retrógrados, sobre receptores CB1 presinápticos, cuya activación provoca una disminución de la liberación de neurotransmisores. Los procesos de degradación de AEA y 2-AG difieren entre sí en lo que se refiere a la maquinaria enzimática y la compartimentalización. Mientras que la AEA se degrada principalmente mediante la acción de una amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *Fatty acid amide hydrolase*) en las dendritas, el 2-AG es catabolizado a través de una monoacilglicerol lipasa (MAGL) en los terminales axónicos. La existencia de transportadores específicos permite la recaptura de los ligandos cannabinoides. Sin embargo, la naturaleza molecular de tales procesos todavía no está del todo clara. Recientemente, ha sido identificada una proteína citosólica que sirve como vehículo intracelular de la AEA y que juega un papel importante en la externalización e internalización de este endocannabinoide [Fu *et al.*, 2012; ver para revisión Fowler (2012) y Marsicano y Chaouloff (2011)]. Este transportador es un derivado de una isoforma de FAAH conocida como FAAH-1, lo cual explicaría su especificidad para la AEA (Fu *et al.*, 2012).

La eficacia de la señalización de los receptores CB1 depende de la disponibilidad de sus ligandos endógenos: primero, y como ya hemos referido anteriormente, el grado de aversión de la situación tiene que ser lo suficientemente alto como para activar la síntesis y liberación de los ligandos cannabinoides. Segundo, la actividad de los endocannabinoides es poco duradera, lo cual se debe principalmente a

que los procesos de recaptación y degradación de estos ligandos endógenos son extremadamente eficaces. Esta característica provoca que los efectos beneficiosos que derivan de la activación de los receptores CB1 se encuentren muy limitados en el tiempo, y de ahí surge la necesidad y el interés de desarrollar métodos farmacológicos que incrementen y prolonguen la acción de los endocannabinoides. En este contexto, se han seguido tres líneas principales de investigación: (i) la administración de agonistas del receptor CB1, (ii) la inhibición de la recaptura de los endocannabinoides, y (iii) el bloqueo de la degradación de los endocannabinoides. La mayoría de los compuestos sintéticos cannabinoides actúan promiscuamente, es decir, su acción no se encuentra limitada a un receptor específico o a una región cerebral en particular, sino que pueden actuar sobre diversas dianas expresadas en diferentes áreas cerebrales (Pertwee *et al.*, 2010). Esta desventaja contribuye a los efectos bifásicos descritos para la mayoría de los compuestos cannabinoides; además, debemos tener en cuenta que los cannabinoides exógenos y los ligandos endocannabinoides pueden llegar a afectar a estructuras cerebrales, a poblaciones neuronales y a sistemas de receptores sin ninguna relación con la expresión de miedo lo que, en ocasiones, puede terminar causando la aparición de efectos opuestos a los deseados. Todo lo anteriormente expuesto remarca la necesidad de refinar las estrategias de intervención sobre el SEC.

En comparación con los efectos aliviadores de la respuesta de miedo que puede conseguirse mediante un incremento de los niveles de AEA (Gunduz-Cinar *et al.*, 2013; Busquets-García *et al.*, 2011), existe poca información sobre la participación específica del 2-AG sobre la regulación del miedo. Por este motivo analizamos sistemáticamente las consecuencias de las manipulaciones farmacológicas del SEC sobre respuestas de miedo exageradas empleando el modelo animal anteriormente descrito. Esta manipulación incluyó la administración de agonistas y antagonistas de los receptores CB1 y CB2, inhibidores de la recaptación de endocannabinoides e inhibidores específicos de la degradación tanto de AEA como de 2-AG. Gracias a nuestros resultados pudimos confirmar que un incremento en los niveles de AEA reduce la expresión de miedo condicionado. Además, observamos que el 2-AG promovió la aparición de la respuesta de miedo, efecto que no había sido descrito hasta el momento y que resulta de su actividad sobre los receptores CB1 expresados en neuronas GABAérgicas.

DISEÑO EXPERIMENTAL



* Tratamientos farmacológicos realizados durante la fase de extinción. Todos los compuestos se inyectaron intraperitonealmente 30 minutos antes de comenzar la prueba, excepto el URB597 y el JZL184 que fueron administrados 120 minutos antes.

AM404 (3 mg/kg)	AM630 (3 mg/kg)
CP-55,940 (1 y 50 µg/kg)	JWH133 (3 mg/kg)
JZL184 (4 y 8 mg/kg)	OMDM198 (1, 2,5 y 5 mg/kg)
SB366791 (1 y 3 mg/kg)	SR141716 (3 mg/kg)
URB597 (0,3 y 1 mg/kg)	VDM11 (3 mg/kg)

Pharmacological enhancement of anandamide and 2-AG levels modifies the expression of conditioned fear in opposite directions

Alvaro Llorente-Berzal¹, Ana Luisa B. Terzian^{2,3}, Vincenzo di Marzo⁴, Maria Paz Viveros¹ & Carsten T. Wotjak^{2*}

¹ Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ Jose Antonio Novais 12, 28040 Madrid and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid (Spain).

² Max-Planck Institute of Psychiatry, RG “Neuronal Plasticity”, Kraepelinstr. 2-10, D-80804 Munich

³ Graduate School of Systemic Neuroscience, Ludwig-Maximilian Universität, Munich, Germany.

⁴ Endocannabinoid Research Group, Institute of Biomolecular Chemistry – C.N.R., Via Campi Flegrei 34, Comprensorio Olivetti, 80078 Pozzuoli(NA), Italy

submitted to: *Neuropsychopharmacology*

*Corresponding author:

Carsten T. Wotjak (PhD); phone: +49 (89) 30622 652; email: wotjak@mpipsykl.mpg.de

Key words: fear extinction, TRPV1, endocannabinoid receptors, URB597, JZL184, AM404

Abstract

We systematically investigated the role of the endocannabinoid system in the expression of auditory-cued fear memories in mice. Administration of the CB1 antagonist/inverse agonist SR141716 (3 mg/kg) caused an increase in conditioned freezing upon repeated tone presentation. Blockade of CB2 receptors by AM630 (3 mg/kg), in contrast, had opposite effects during the first tone presentation, with no effects of the TRPV1 antagonist SB366791 (1 and 3 mg/kg). Administration of the CB2 agonist JWH133 (3 mg/kg) failed to affect the acute freezing response, whereas the CB1 agonist CP55,940 (50 μ g/kg) augmented this behavior. The endocannabinoid uptake inhibitor AM404 (3 mg/kg), which is also a TRPV1 agonist, but not VDM11 (3 mg/kg), significantly reduced the acute freezing response. Its co-administration with SR141716 or SB366791 confirmed an involvement of both CB1 and TRPV1. Inhibition of AEA degradation by the FAAH inhibitor URB597 (1mg/kg) had similar consequences as AM404. Inhibition of 2-AG degradation by the MAGL inhibitor JZL184 (4 and 8 mg/kg), in contrast, caused a pronounced increase in freezing, similar to CP55,940. This provides first evidence for opposite consequences of 2-AG vs. AEA in the same behavioral dimension. As revealed in conditional CB1-deficient mutants, the fear-promoting effects of 2-AG depended on CB1 signaling in GABAergic neurons. Our findings suggest that increased AEA levels mediate acute fear relief via CB1 on glutamatergic neurons, while increased 2-AG levels—promote the expression of conditioned fear via CB1 on GABAergic neurons. This dichotomy in endocannabinoid action has to be considered for the exploitation of the endocannabinoid system as a treatment of psychiatric disorders associated with exaggerated fear responses.

Introduction

Since its initial description (Marsicano et al, 2002), numerous studies have confirmed the involvement of the cannabinoid receptors type 1 (CB1) in fear regulation (for review see Riebe et al, 2012). Nowadays, much is known about the complexity of the underlying processes related to CB1 actions, which include opposite roles of CB1 depending on its location - on glutamatergic (Kamprath et al, 2009) and dopamine D1 receptor positive neurons (Terzian et al, 2011), on the one hand, or on GABAergic neurons (Metna-Laurent et al, 2012), on the other hand. Moreover, there is evidence for an involvement of cannabinoid receptor type 2 (CB2; Tambaro and Bortolato, 2012) and transient receptor potential vanilloid receptor type 1 (TRPV1; Moreira et al, 2012) in controlling aversive effects.

Of the two major endocannabinoids, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), is synthesized in postsynaptic sites (e.g. dendritic spines) and acts as retrograde messenger at presynaptically expressed CB1. Anandamide (AEA) can also exert this function under certain circumstances, but may also be produced pre-synaptically and act as an anterograde mediator (see Di Marzo, 2011 for review). Presynaptic CB1 activation by these endocannabinoids results in a decrease in neurotransmitter release. Degradation processes, however, show remarkable differences between AEA and 2-AG in terms of enzymatic machinery and compartmentalization: whereas AEA is primarily degraded by fatty acid amide hydrolase (FAAH) in dendrites (McKinney and Cravatt, 2005), 2-AG is primarily cleaved by monoacylglycerol lipase (MAGL) in axon terminals (Dihn et al, 2002). Due to their lipophilic nature as fatty acid derivatives, AEA and 2-AG would be expected to accumulate in the postsynaptic membrane rather than to exert trans-synaptic effects. The latter is achieved by specific transporters, which mediate release and uptake of the endocannabinoids, although the molecular nature of these processes is still far from being clear. Recently, a cytosolic protein was identified, which serves as an intracellular shuttle for AEA and plays an important role for externalization and internalization of this endocannabinoid (Fu et al, 2012; for reviews see Fowler, 2012; Marsicano and Chaouloff, 2011). The FAAH-1-like anandamide transporter (FLAT) turned out to be an alternative splicing product of the FAAH isoform FAAH-1. This explains the substrate specificity for AEA as compared to 2-AG (Fu et al, 2012).

The efficacy of CB1 signaling critically depends on the availability of its endogenous ligands. First, the aversiveness of a situation has to be high enough in order to activate the “on demand” synthesis and release of AEA and 2-AG (Riebe et al, 2012). Second, the capacity of the endocannabinoids appears to be limited by tightly regulated uptake and degradation processes, which confine the beneficial effects of CB1 signaling and might be responsible of exaggerated fear responses. This explains the broad interest in developing pharmacological approaches, which increase and prolong (endo)cannabinoid action. In this context, two different strategies are pursued: (i) direct CB1 activation by administration of CB1 agonists, and (ii) increase of endocannabinoid tone by inhibition of endocannabinoid uptake and/or blockade of endocannabinoid degradation. Most of the synthetic cannabinoids act in a promiscuous manner, i.e. they simultaneously affect multiple components of the endocannabinoid system, which themselves show various interdependencies (Pertwee et al, 2010). These drawbacks might contribute to the biphasic effects described for most of the compounds, keeping in mind that exogenous and endogenous cannabinoids may act on brain structures, neuronal populations and receptor systems which are either totally unrelated to the expression of fear or contrarily involved. This illustrates the need for a refinement of our intervention strategies.

Compared to the fear-alleviating effects of enhanced AEA signaling (Busquets-Garcia et al, 2011; Gunduz-Cinar et al, 2013), surprisingly little is known about the specific involvement of 2-AG in fear regulation. For this reason we systematically analyzed the consequences of pharmacological manipulations of the endocannabinoid system on exaggerated fear responses. This included the administration of CB1 and CB2 antagonists and agonists, endocannabinoid uptake inhibitors and specific inhibitors of AEA or 2-AG degradation. We confirmed that enhanced AEA levels reduce the expression of conditioned fear. In addition, to the best of our knowledge, we observed for the first time fear-promoting effects of 2-AG, which depended on CB1 expressed in GABAergic neurons.

Material and Methods

Animals

Male C57BL/6NCrl (B6N) mice were purchased from Charles River (Bad Sulzfeld, Germany) at age of 6-7 weeks. Mice with conditional deletion of CB1 from cortical glutamatergic (Glu-CB1-KO) or GABAergic neurons of the forebrain (GABA-CB1-KO) were kept on a mixed genetic background with a predominant B6N contribution. They were generated, bred and genotyped essentially as described (Metna-Laurent et al, 2012), from our local breeding stocks (MPI for Biochemistry, Martinsried, Germany) and transferred to our animal facility when they were 8-12 weeks old.

Mice were singly housed under an inverse 12h:12h light-dark cycle (lights off: 09:00 a.m.), under standard laboratory conditions with water and food *ad libitum* for at least 12 days before starting with the experiments. All experiments were carried out according to the European Community Council Directive 2010/63/EEC and approved by the local government of Upper Bavaria (55.2.1.54-2532-44-09 and 55.2.1.54-2532-141-12). Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Drugs

AM630, JWH133, SB366791 and JZL184 were purchased from Tocris (Bristol, UK); AM404, CP55,940 and URB597 from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); SR141716 and VDM11 from Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) and OMDM198 was provided by Dr Vincenzo Di Marzo. Doses and vehicle were chosen based on previous findings (Busquets-Garcia et al, 2011; Rey et al, 2012; Micale et al, 2013), in the case of OMDM198 we followed recommendations made by Dr Vincenzo Di Marzo. Thus, AM404 (3 mg/kg), VDM11 (3 mg/kg), OMDM198 (1, 2.5 and 5 mg/kg) and CP55,940 (1 and 50 µg/kg) were dissolved in ethanol: Cremophor (Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany): saline in a 1:1:18 concentration. For AM630 (3 mg/kg), JWH133 (3 mg/kg), SB366791 (1 and 3 mg/kg) and SR141716 (3 mg/kg) vehicle was a mixture of 3 drops of Tween-80 (Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany) in 10 ml 2.5% dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany) in saline. URB597 (1 mg/kg) and JZL184 (4 and 8 mg/kg) were dissolved in 15% DMSO: 4.25% polyethylene glycol (Carl Roth; Karlsruhe, Germany):

4.25% Tween 80: 76.5% saline. All pharmacological treatments were administered intraperitoneally in an injection volume of 10ml/kg.

Fear conditioning

At day 0 (d0), mice were placed into cubic-shaped conditioning chambers with metal walls and metal grid floor (Kamprath and Wotjak, 2004). After 180 s, a 20s sine wave tone (9 kHz, 80 dB) was presented, which co-terminated with a 2s electric foot shock (shocker/ scrambler: ENV-414, MED Associates). Except for the first experiment, the shock intensity was 1.5 mA, which was about 5 times the individual pain threshold of B6N mice (Siegmund et al, 2005; Siegmund and Wotjak, 2007). After the shock presentation, mice remained in the chamber for another 60 s. Between sessions, the conditioning chamber was cleaned with 70% ethanol. Mice were re-exposed to the tone for 3 min at d1, d2, d3 and d10 after conditioning. This time, they were placed into a neutral test context with cylindrical shape and bedding. After 180s, tone was presented for 3 min, and after another 60s mice were returned to their home cages. In this neutral context, the bedding was renewed and scented with 1% acetic acid. Conditioning and test contexts differed in multiple aspects, including shape, texture and odor (Kamprath and Wotjak, 2004), which kept generalized contextual fear at a minimum (Golub et al, 2009). This enabled us to specifically study the involvement of endocannabinoids/ endovanilloids in the expression of auditory-cued fear memory. The behavior of the animals was recorded and analyzed off-line by a trained observer (EVENTLOG software, designed by Robert Henderson, 1986).

Open field test

The open field test was performed in the TruScan Photo Beam Activity system (Coulbourn Instruments, Whitehall, PA, USA) as described previously (Jacob et al, 2009) under red light. Mice were placed into the center of a Plexiglas chamber (L26 cm × W26 cm × H38 cm) for 15 min. Horizontal locomotion and vertical exploration were automatically recorded by two photobeam sensor rings (2 cm and 5 cm above the floor; photobeams are spaced apart by 1.52 cm providing a 0.73 cm spatial resolution) which surrounded the Plexiglas chambers. Each test cage, including the sensor rings, was enclosed by opaque Plexiglas side walls (L47 cm × W47 cm ×

H38.5 cm). The floor was cleaned with soap and water, and dried after each test session. Data were acquired with a sample rate of 4 Hz. The following measures were automatically calculated by TruScan Software Version 1.1 (Coulbourn Instruments): (i) movement time (s), (ii) distance moved in the horizontal plane (cm) and (iii) the number of vertical explorations (rearings).

Experiments

All experiments were performed during the active phase of the animals between 09:30 and 17:00h. The experimenter was blind to the treatment/genotype during both experiments and behavioral analyses. If not stated otherwise, drug treatment happened 30 minutes before re-exposure to the tone at d1, d2 and d3 after conditioning, except for URB597 and JZL184 which were administered 120 minutes before in order to ensure adequate functionality (Micale et al, 2013). At d10, all mice were treated with vehicle. Treatment before exposure to the open field was the same as used at d1-d3. All experiments are described in the results section.

Data analysis and statistics

Freezing behavior was manually scored as described (Kamprath and Wotjak, 2004), analyzed in 20s bins and expressed as a percentage of the observation intervals (i.e. 20s). Open field behavior was analyzed in 3 min bins. Data are shown as mean \pm SEM. They were analyzed by 2-way ANOVAs for repeated measures, with the main factors *current intensity / drug* and the repeated measure *time interval/ day*, followed by Newman-Keuls post-hoc test, if appropriate (Statistica 5, StatSoft). The sample sizes are depicted in the figures. Care was taken to use similar sample sizes for each experimental group of a given experiment. A $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Conditioning with 1.5 mA promotes long-lasting freezing response to the tone

To study the consequences of repeated drug administration on expression of conditioned fear, we first established a conditioning protocol, which result in sustained freezing upon repeated tone presentations. For this reason, we conditioned 3 groups of B6N mice with a single tone-shock pairing (d0), whereby the intensity of the foot shock was 0.5 mA, 0.75 mA or 1.5 mA, followed by repeated re-exposure to tone (for 3 min each) at d1, d2, d3 and d10. To mimic the pharmacological interventions to come, we treated all animals with saline 30 min before each test session. As shown in figure 1A, conditioning with 1.5 mA caused the most prominent fear response to the tone at d1 [shock intensity: $F_{2,28} = 4.77$, $p = 0.016$; 2-way ANOVAs (shock intensity, time interval) for repeated measures (time interval)], d2 (shock intensity: $F_{2,28} = 4.76$, $p = 0.016$), d3 (shock intensity x time interval: $F_{16,224} = 1.81$, $p = 0.031$) and, in tendency, d10 (shock intensity: $F_{2,27} = 2.60$, $p = 0.092$; Fig. 1A). Therefore, we decided to use the highest shock intensity for the subsequent experiments.

Pharmacological blockade of CB1 and CB2, but not TRPV1, modulates the freezing response in opposite directions

We next assessed whether endocannabinoid/endovanilloid signaling via CB1, CB2 and/or TRPV1 is involved in the sustained freezing response to the tone after conditioning with 1.5 mA. For this reason, we treated new groups of B6N mice with the TRPV1 antagonist SB366791 (1 and 3 mg/kg), the CB1 receptor antagonist/inverse agonist SR141716 (3 mg/kg), the CB2 receptor antagonist/inverse agonist AM630 (3 mg/kg), or the respective vehicle before re-exposure to the tone at d1, d2 and d3 after conditioning. At d10, all mice received vehicle in order to estimate long-term effects of the pharmacological interventions. Treatment with SB366791 did not affect the freezing response (d1-d3, drug: $F_{2,27} < 1.04$, $p > 0.369$; drug x time interval: $F_{16,216} < 1.08$, $p > 0.368$; Fig. 1B); however, treatment with SR141716 further prolonged freezing, which could be statistically secured for d2 after conditioning (drug x time interval: $F_{8,168} = 2.29$, $p = 0.023$). There was also a long-lasting effect of treatment, which could be observed at d10 (drug: $F_{1,20} = 4.63$, $p = 0.043$; Fig. 1C). Treatment with AM630, in contrast, significantly

reduced freezing at d1 after conditioning (drug x time interval: $F_{8,168} = 3.16$, $p = 0.002$), without any effect at the subsequent days (statistics not shown; Fig. 1D). Together, these data indicate that CB1 and CB2 receptors modulate the expression of conditioned fear in opposite directions, with no evidence for an involvement of tonic TRPV1 activity. The fear promoting effects of CB2 became evident only during the first tone presentation; the fear alleviating effects of CB1 could be observed only upon repeated tone exposure.

An exogenous CB1 agonist further enhances conditioned fear responses, whereas a CB2 agonist shows no effects

Treatment of B6N mice with a low dose of the CB1 agonist CP55,940 (1 $\mu\text{g/kg}$) had no effects on freezing. A higher dose (50 $\mu\text{g/kg}$), in contrast, further enhanced conditioned fear (Fig. 1E). This became evident at d2 (drug: $F_{2,32} = 3.54$, $p = 0.041$) and d3 (drug: $F_{2,32} = 6.79$, $p = 0.003$) after conditioning. There were no lasting consequences of the treatment, since we failed to observe any group difference at d10, when all mice received vehicle before testing (drug: $F_{2,31} = 1.09$, $p = 0.348$).

Administration of the CB2 agonist JWH133 (3 mg/kg ; Fig. 1F) induced no significant effects (d1-d3, drug: $F_{1,21} < 0.83$, $p > 0.372$; drug x time interval: $F_{8,168} < 1.32$, $p > 0.237$).

Insert Figure 1 around here

Interference with endocannabinoid uptake and/or degradation has bidirectional effects on conditioned fear responses

To assess whether enhancement of endocannabinoid signaling may have similar fear promoting effects as revealed for CP55,940, we tested various compounds with different levels of specificity in terms of enhancing AEA and/or 2-AG action.

Treatment with VDM11 (3 mg/kg ; Fig. 2A), an endocannabinoid uptake inhibitor with no direct action at TRPV1 (De Petrocellis et al., 2000), failed to modulate the freezing response (d1-d3, drug: $F_{1,14} < 0.43$, $p > 0.519$; drug x time interval: $F_{8,112} < 1.14$, $p > 0.339$). In contrast, treatment

with AM404 (3 mg/kg; Fig. 2B), another endocannabinoid uptake inhibitor, which also activates TRPV1 (De Petrocellis et al., 2000), turned the sustained into a decaying freezing response at d1 (drug x time interval: $F_{8,272} = 4.52$, $p = 0.006$) and, in tendency, at d2 (drug x time interval: $F_{8,272} = 1.90$, $p = 0.060$) and d3 (drug x time interval: $F_{8,256} = 1.97$, $p = 0.050$). As demonstrated by co-treatment with the CB1 antagonist/inverse agonist SR141716 or the TRPV1 antagonist SB366791, the fear alleviating effects of AM404 involved signaling via both CB1 and TRPV1 (d1, drug x time interval: $F_{24,256} = 2.38$, $p < 0.001$; d2, drug x time interval: $F_{24,256} = 1.59$, $p = 0.043$; d3, drug: $F_{3,31} = 2.64$, $p = 0.066$; Fig. 2C).

AM404 was identified as an inhibitor of the AEA transporter FLAT (Fu et al, 2012). Therefore, the efficacy of AM404 in promoting fear relief might be due to enhanced AEA signaling. To verify this assumption, we treated the animals with the selective FAAH inhibitor URB597 (0.3 mg/kg, 1 mg/kg; Fig. 2D). Indeed, URB597 (1 mg/kg) decreased the freezing response to the tone at d2 (drug: $F_{2,33} = 3.63$, $p = 0.037$) and, in tendency, at d3 (drug: $F_{2,33} = 2.80$, $p = 0.074$) after conditioning. These fear alleviating effects lasted until d10 (drug: $F_{2,32} = 3.20$, $p = 0.053$), when all animals received vehicle before testing.

Differently from URB597, treatment with OMDM198 (1 mg/kg – 5 mg/kg; Fig. 2E), a combined FAAH inhibitor / TRPV1 antagonist, failed to modulate the freezing response (d1-d3, drug: $F_{3,35} < 0.75$, $p > 0.529$; drug x time interval: $F_{24,280} < 1.17$, $p > 0.262$).

Finally, we studied the consequences of enhanced 2-AG signaling on the expression of conditioned fear. Treatment with the MAGL inhibitor JZL184 (4 mg/kg, 8 mg/kg; Fig. 2F) had essentially the opposite behavioral consequences when compared to AM404 and URB597: both doses led to enhanced freezing at d1 (drug: $F_{2,33} = 3.22$, $p = 0.053$), d2 (drug: $F_{2,33} = 3.45$, $p = 0.043$; drug x time interval: $F_{16,264} = 1.86$, $p = 0.023$) and d3 (drug: $F_{2,33} = 5.41$, $p = 0.009$). Post-hoc analyses did not reveal differences between the two doses; however, 4 mg/kg appeared to be slightly more efficient in respect to vehicle treatment. There were no lasting consequences of JZL184 treatment observable at d10 (drug: $F_{2,33} = 0.09$, $p = 0.908$).

Insert Figure 2 around here

Fear-promoting effects of JZL184 depend on CB1 signaling in GABAergic neurons

Until this point, we demonstrated that pharmacological enhancement of AEA signaling reduced conditioned fear, while enhanced 2-AG signaling promoted it, similar to treatment with a CB1 agonist. Thus, to better understand such differences, we decided to evaluate which neuronal subpopulation is involved in the effects of JZL184. For this reason, conditional CB1-deficient mice which lack expression of CB1 receptors either in cortical glutamatergic (Glu-CB1-KO) or in GABAergic neurons (GABA-CB1-KO) were treated with vehicle or JZL184 (4 mg/kg) before re-exposure to the tone at d1, d2 and d3; at d10 all mice received vehicle.

For the assessment of genotype differences in expression of conditioned fear, we first compared vehicle-treated KO and WT littermate controls. GABA-CB1-KO showed a slight decrease in conditioned fear, which became statistically significant at d2 (genotype x time interval: $F_{8,264} = 3.07$, $p = 0.002$; Fig. 3A). Glu-CB1-KO, in contrast, showed significantly enhanced freezing throughout the experiment (d1-d10, genotype: $F_{1,17} > 4.82$, $p < 0.042$; d2, genotype x time interval: $F_{8,136} = 3.33$, $p = 0.001$; Fig. 3B).

Insert Figure 3 around here

For a deeper analysis, we next analyzed the behavioral consequences of JZL184 separately per genotype. In GABA-CB1-WT, JZL184 led to strongly enhanced freezing (d1-d3, drug: $F_{1,25} > 10.2$, $p < 0.003$; d1+d2, drug x time interval: $F_{8,208} > 5.38$, $p < 0.001$; Fig. 4A). Also in Glu-CB1-WT, JZL184 caused an increase in freezing, which was less pronounced than in GABA-CB1-WT and reached statistical significance only at d3 ($F_{1,17} = 5.13$, $p = 0.036$; Fig. 4D). Such differences in drug efficacy between GABA-CB1-WT and Glu-CB1-WT may be related to differences in the genetic background of the two mutant lines and to the relatively low dose of JZL184 administered. At d10 no persistent effects of JZL184 were found (statistics not shown).

The effects of JZL184 were completely abolished in GABA-CB1-KO (d1-d3, drug: $F_{1,26} < 0.533$, $p > 0.471$; drug x time interval: $F_{8,208} < 1.62$, $p > 0.120$; Fig. 4B). Also Glu-CB1-KO failed to respond to JZL184 (d1-d3, drug: $F_{1,17} < 0.264$, $p > 0.613$; drug x time interval: $F_{8,136} < 0.627$, $p > 0.753$; Fig. 4E). However, Glu-CB1-KO showed strong freezing already upon vehicle treatment. This bears the risk of ceiling effects, which might obscure any additional fear-promoting consequences of JZL184.

The genotype differences in the response to JZL184 were confirmed by 3-way ANOVAs (drug, genotype, day) for repeated measures (day), whereby we considered the total freezing duration in response to the tone at d1 – d3. For GABA-CB1-KO we obtained a significant drug x genotype interaction ($F_{1,50} = 4.04$, $p = 0.049$), indicating that JZL184 increased freezing in GABA-CB1-WT, but not GABA-CB1-KO (Fig. 4C). In Glu-CB1-KO, we only obtained a significant genotype difference ($F_{1,33} = 8.98$, $p = 0.005$), but no genotype x treatment interaction ($F_{1,33} = 0.68$, $p = 0.412$; Fig. 4F).

Insert Figure 4 around here

Alterations in freezing cannot be explained by general changes in locomotor activity

Alterations in endocannabinoid/ endovanilloid signaling may interfere with locomotor activity. This would confound the interpretation of changes in the freezing response. Therefore, we tested all pharmacological and genetic interventions for their effects on horizontal locomotion (mobility time, distance moved) and vertical explorations (number of rearings) during a 15 min exposure to an activity chamber, 16 days after conditioning (Fig. S1; see Suppl. Tab. 01 for details of statistical analysis). In case of pharmacological interventions, mice received the same treatment as used for manipulating the expression of conditioned fear (i.e., d1-d3). Since experiments were performed with shocked mice, changes in locomotor activity cannot be dissociated from effects on emotionality, even though exposures were performed under low aversive conditions. Nevertheless, the results obtained allow us to draw conclusions about the specificity of the drug effects for expression of conditioned fear.

Among all treatments, we only observed significant changes in locomotor behavior for the following interventions:

(i) Treatment with the CB1 antagonist/ inverse agonist SR141716 caused a decrease in horizontal and vertical movements, which became statistically significant after the first 3 min of the exposure. This finding limits the interpretation of the increase in freezing observed after SR141716 treatment (Fig. 1C, 2C).

(ii) Treatment with AM404 led to a slight increase in distance moved, but not moving time. The fact that the effects on the distance were restricted to the first 3 min of the exposure with no changes in the general activity (as reflected by the moving time) renders it unlikely that the decrease in freezing to the tone caused by AM404 (Fig. 2B,C) simply relates to hyperlocomotion.

(iii) Treatment with VDM11 caused a significant decrease in the total distance moved and the number of rearings. This finding demonstrates that the dose chosen (5 mg/kg) was biologically active in terms of changes in general activity. This rules out that our failure to observe significant changes in freezing (Fig. 2A) simply results from an inappropriate dose. However, the decrease in mobility bears the risk of masking potential fear-alleviating effects of the drug.

None of the other treatments including URB597 and JZL184 had a significant effect on locomotion (Fig. S1, Suppl. Tab. 01). Consequently, the decrease and increase in freezing caused by the same compounds, respectively (Fig. 2D, F), appears to be genuine for the expression of conditioned fear, since it cannot be explained by general changes in locomotor activity. This applies also to the treatment with CP55,940, which caused a slight, non-significant decrease in locomotion for both concentrations (1 µg/kg and 50 µg/kg). However, given the observation that only the higher dose had potentiated the freezing response (Fig. 1E), it is unlikely that this fear promoting effect relates to general changes in locomotion.

GABA-CB1-KO and their wild-type controls differed in locomotor activity (movement time - genotype x interval: $F_{4,104} = 3.47$, $p = 0.010$; distance - genotype x interval: $F_{4,104} = 2.89$, $p = 0.025$; Fig. S2), however, irrespective of the treatment (movement, distance - genotype x treatment: $F_{1,26} < 0.27$, $p > 0.602$; genotype x drug x interval: $F_{4,104} < 0.72$, $p > 0.580$). The genotype differences reflect the slightly more pronounced decrease in locomotor activity in GABA-CB1-KO compared to GABA-CB1-WT towards the end of the exposure. Therefore, the genotype differences in the fear-promoting effects of JZL184 (Fig. 4A) cannot be explained by general changes in exploratory behavior.

Discussion

This study investigated the consequences of pharmacologically enhanced AEA vs. 2-AG signaling on the expression of conditioned fear. We demonstrate that inhibition of AEA uptake/degradation reduces freezing. In particular, in the case of AEA uptake inhibition with AM404, the freezing-reducing effect appeared to be due to both CB1 and TRPV1 activation. Inhibition of 2-AG degradation, in contrast, promoted freezing, which was similar to the effects of a CB1 agonist and dependent on CB1 expressed by GABAergic neurons.

There are numerous reports about an association between aversiveness of the test situation and involvement of the endocannabinoid/endovanilloid system in regulation of fear and anxiety (Haller et al, 2004; Marsch et al, 2007; Naidu et al, 2007), including the expression of conditioned fear (Kamprath et al, 2009; Jacob et al., 2012). Given their potential as new therapeutic interventions for the treatment of PTSD (Trezza and Campolongo, 2013), we decided to systematically investigate consequences of altered endocannabinoid/endovanilloid signaling on strong fear responses. For this reason we established an auditory fear conditioning protocol, which resulted in a prominent freezing response to the tone. In accordance with our previous observations (Plendl and Wotjak, 2010), prolonged tone presentations kept the freezing responses relatively stable over the course of repeated exposures. This enabled us to analyze the effects of acute (d1) and repeated (d1-3) treatment, as well as long-term consequences of the pharmacological interventions (d10). To equalize confounding consequences of the treatment procedure *per se*, all animals received vehicle not only during establishment of the conditioning protocol, but also before re-exposure to the tone at d10. It is of note that the injection procedure *per se* seems to affect the freezing response: in the case of treatment with URB597 or JZL184, mice were injected 2h before re-exposure to the tone in order to ensure adequate blockade of the degrading enzymes (Micale et al, 2013). Under those circumstances, vehicle-treated controls showed an acute decline in freezing over the course of the tone presentation. This was in striking contrast to the non-decaying freezing responses observed 30 min after vehicle injection. Currently we can only speculate about the reasons for this difference, which may involve an activation of endocannabinoid/endovanilloid signaling. At any rate, the temporal dynamics of stress-related changes in freezing have to be considered during the interpretation of our data, even though their impact might be of minor importance.

Endocannabinoids are known to promote acute fear relief via CB1 (for review see Riebe et al, 2012). The sustained, non-decaying fear responses exhibited by the animals submitted to our conditioning and extinction protocol may, thus, result from insufficient CB1 signaling (Moreira and Wotjak, 2010). Alternatively, they might be ascribed to enhanced activity of two other (endo)cannabinoid targets, CB2 and TRPV1, both previously reported to promote fear and/or anxiety (Tambaro and Bortolato, 2012; Moreira et al, 2012; Marsch et al, 2007). We ruled out this alternative, since we failed to observe any fear-alleviating consequences of the TRPV1 antagonist SB366791. On the other hand, blockade of CB2 by AM630 caused only a slight decrease in fear at d1 and had no effects during subsequent tone presentations (d2, d3). Administration of the CB2 agonist JWH133, in turn, failed to affect the freezing response at all. As a consequence, insufficient activation of CB1 rather than activation of CB2 or TRPV1 seems to underlie the sustained freezing response observed in our fear conditioning and extinction model. In line with this conclusion, the CB1 antagonist/ inverse agonist SR141716 did not further enhance freezing (except for a slight effect at d3), which might be ascribed to ceiling effects. Accordingly, previous studies reported an enhancement of fear expression by SR141716 following conditioning with weaker shock intensities (Marsicano et al, 2002; Kamprath et al, 2006, 2009; Niyuhire et al, 2007; Plendl and Wotjak, 2010; Riebe et al, 2012).

Against our expectations, administration of the CB1 agonist CP55,940 not only did not result in decreased freezing, but even promoted the expression of conditioned fear. This was the case for the higher dose (50 µg/kg), whereas the lower dose (1 µg/kg) had no effects. We ruled out in an open field test that the increase in freezing caused by the higher dose simply resulted from a general decrease in locomotor activity, which is a known “side effect” of exogenous cannabinoids such as CP55,940 (Llorente-Berzal et al, 2011; McGregor et al, 1996). Interestingly, a recent study reported anxiogenic vs. anxiolytic consequences of exactly the same two doses of CP55,940. These effects could be related to a differential involvement of CB1 receptors on GABAergic vs. glutamatergic neurons (Rey et al, 2012). This led us to hypothesize that also the paradoxical fear-promoting consequences of increased CB1 signaling critically depends on the neuronal subpopulation involved. However, the fear-promoting effects of CP55,940 might result from an activation of CB1 receptors in brain structures completely unrelated to the expression of conditioned fear, thus representing a pure pharmacological phenomenon. We assumed that increasing endocannabinoid levels by inhibiting endocannabinoid

inactivation might render a better idea of what is the role of the endocannabinoid system in the control of conditioned fear. Therefore, we first proceeded to investigate the effect that enhanced CB1 signaling has on the freezing response to the tone under physiological conditions, before we identified the neuronal subpopulation which mediates the CB1-mediated fear-promoting effects. For this reason we systematically increased the availability of AEA and/or 2-AG, and studied the consequences of this manipulation on expression of conditioned fear. We obtained the following findings: (i) the endocannabinoid uptake inhibitor AM404, but not VDM11, turned the sustained freezing response into a decaying freezing response; (ii) Blocking the degradation of AEA by URB597 also decreased the expression of conditioned fear; (iii) Blocking the degradation of 2-AG by JZL184, in contrast, promoted the expression of conditioned fear, similarly to CP55,940.

The fear-alleviating effects of URB597 are in accordance with the literature (Busquets-García et al, 2011; for reviews see Riebe et al, 2012; Micale et al, 2013). They demonstrate that enhanced AEA signaling attenuates the freezing response to the tone. The effects of URB597 seem to outlast the acute consequences on fear relief, since we observed a lasting decrease in freezing also at d10, i.e. without additional URB597 treatment. These long-term effects might be ascribed to enhanced long-term extinction of conditioned fear; however, URB597 is an irreversible inhibitor of FAAH (Kathuria et al, 2003), and FAAH activity is not fully reconstituted 10 days after a single injection of AM3506, another irreversible FAAH inhibitor (Gunduz-Cinar et al, 2013). Therefore, we cannot entirely rule out that the biochemical effects of three injections of URB597 (d1-d3, 1mg/kg each) were maintained until d10. This would have the consequence that the increased availability of AEA acutely facilitates fear relief also at d10.

AM404 had essentially the same effects on acute fear relief as URB597. This suggests that its effects primarily relate to blockade of AEA rather than 2-AG uptake. Such selectivity is supported by AM404 effects on the FAAH-like anandamide transporter (FLAT), which is responsible in part for the uptake of AEA, but not 2-AG, and which is inhibited by AM404 (Fu et al, 2012). However, VDM11, another endocannabinoid uptake inhibitor which blocks FLAT with the same efficacy as AM404 (Fu et al, 2012), failed to affect the freezing response. Currently we do not know whether this discrepancy relates to different effects of the two drugs on locomotor activity or to subtle differences in blocking the uptake of AEA vs. 2-AG. In fact, AM404 seems to inhibit the uptake of 2-AG as well (Beltramo and Piomelli, 2000; Bisogno et al, 2001; Wiskerke et al, 2012) by yet unknown mechanisms (Fowler, 2012). It is possible that inhibition

of AEA cellular reuptake is *per se* not sufficient to inhibit conditioned fear and that the behavioral consequences of AM404 result not only indirectly from enhanced CB1 signaling, but also directly from activation of TRPV1, since this compound is a potent agonist at this channel too (De Petrocellis et al, 2000; Zygmunt et al, 2000; Ralevic et al, 2001; Ross et al, 2001). In line with this reasoning, we could block the fear-alleviating effects of AM404 not only with a CB1 antagonist, but also with a TRPV1 antagonist. This observation extends our current concepts about yin-yang effects of CB1 vs. TRPV1 signaling in fear and anxiety: indeed, we suggest that enhanced CB1 and TRPV1 signaling may not only exert opposite effects (Moreira et al, 2012), but also act in the same direction, by promoting acute fear relief. This observation may also explain our failure to promote fear relief by administration of OMDM198, another FAAH inhibitor, which serves as a TRPV1 antagonist at the same time (Maione et al, 2013).

Our observation that pharmacological inhibition of the MAGL by JZL184 results in an enhanced freezing response provides the first demonstration that the increased availability of 2-AG may promote the expression of conditioned fear. However, mice treated with JZL184 may show classical tetrad responses, including hypolocomotion (Long et al, 2009), which might be mistaken for increased freezing. Therefore, we confirmed in an open field task that treatment with JZL184 failed to affect general locomotor activity. It is conceivable that JZL184 decreases locomotion only at higher doses (16 mg/kg, Long et al, 2009) than those used in the present study (4 and 8 mg/kg). This might explain also why we failed to observe the previously reported development of tolerance to repeated JZL184 treatment (40 mg/kg, 6 days; Schlosburg et al, 2010), which is in accordance with another study using 8 mg/kg JZL184 for 6 days (Busquets-Garcia et al, 2011). In the present study JZL184 (4 mg/kg, 3 days) exerted its prominent effects also during the third injection. In fact, the effects of JZL184 were even more pronounced upon repeated treatment. It is tempting to relate this observation to the “priming” of 2-AG synthesis, which has been observed after repeated exposures to a homotypic stressor (Patel et al, 2005; Hill et al, 2010). Accordingly, JZL184 would be most effective in situations with increased 2-AG synthesis. The fear-promoting effects of JZL184 appear to be at odds with its anxiolytic effects (Busquets-Garcia et al, 2011; Kinsey et al, 2011; Sciolino et al, 2011; Aliczki et al, 2013; Almeida-Santos et al, 2013). Apparently, 2-AG differentially affects the acute expression of conditioned fear and anxiety-like behavior in exploration-based anxiety tasks. In this context it is of note that the anxiolytic effects were reported for doses of 8 mg/kg or higher, whereas the most prominent

effects of JZL184 on freezing were observed with 4 mg/kg. In addition, the anxiolytic effects of 2-AG seem to be mediated, at least in part, by CB2 receptors (Busquets-Garcia et al, 2011; Almeida-Santos et al, 2013), whereas, in our case, the fear alleviating effects of AM404 depended on CB1 and TRPV1 signaling.

The question remained as to the mechanisms behind the fear-promoting effects of 2-AG. To answer this question, we used conditional mouse mutants which lack expression of CB1 either in cortical glutamatergic neurons (Glu-CB1-KO) or GABAergic neurons of the forebrain (GABA-CB1-KO). Behavioral analyses of vehicle-treated mutants and wild-type controls confirmed the previously reported increase in conditioned fear in Glu-CB1-KO (Kamprath et al, 2009; Metna-Laurent et al, 2012) and decrease in GABA-CB1-KO (Metna-Laurent et al, 2012). Consequently, endocannabinoids seem to facilitate fear relief via CB1 on glutamatergic terminals, while they promote fear expression via CB1 on GABAergic neurons. Similar yin-yang effects of endocannabinoid actions at the two neuronal populations were reported for anxiety (Rey et al, 2012), novelty seeking (Lafenetre et al, 2009), food intake (Bellocchio et al, 2011), potentiation of descending antinociception (Maione et al, 2006) and avoidance learning (Metna-Laurent et al, 2012). In line with fear-promoting effects of CB1 on GABAergic neurons, the fear promoting effects of enhanced 2-AG signaling were completely abolished in GABA-CB1-KO. The lack of freezing potentiation in Glu-CB1-KO, in contrast, is inconclusive due to the high freezing levels already shown by these animals when treated with vehicle, and the subsequent possibility of ceiling effects, which may have masked any further increase in freezing caused by JZL184.

Without disregarding the complexity of 2-AG signaling including its effects on glutamatergic transmission, histological and electrophysiological studies provide compelling evidence for the involvement of 2-AG in regulating GABAergic transmission as a retrograde messenger (Alger and Kim, 2011; Di Marzo, 2011; Luchicchi and Pistis, 2012). This relates, among others, to the presence of MAGL, but not FAAH, in inhibitory neurons (Gulyas et al, 2004; Uchigashima et al, 2011) as well as to the absence of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) if the synthesis of 2-AG is abolished by genetic means (Tanimura et al, 2010; Gao et al, 2010; Yoshino et al, 2011). By contrast, enhanced 2-AG signaling resulting from pharmacological or genetic attenuation of 2-AG degradation, prolongs DSI (Kim and Alger, 2004; Hashimotodani et al, 2007; Pan et al, 2011).

We wish to summarize the findings of the present study in the following hypothetical scenario: Endocannabinoids exert a bidirectional control of acute fear responses. On the one hand, fear relief results from the acute down-regulation of glutamatergic transmission by AEA (Riebe et al, 2012). Synthesis and release of AEA depends on the aversiveness of the test situation and likely involves the spill-out of excessively released glutamate out of the synaptic zone, where it reaches extrasynaptic metabotropic glutamate receptors (Katona and Freund, 2008; Moreira and Wotjak, 2010; Hill et al, 2010). In highly-aversive situations, the fear-alleviating effects of AEA are limited by uptake and degradation processes, which restrict the bioavailability of the endocannabinoid. Accordingly, inhibitors of the AEA transporter FLAT (e.g. AM404) or the degrading enzyme FAAH (e.g. URB597) promote fear relief in particular in highly aversive situations. This process involves TRPV1 in addition to CB1 signaling, since either inhibitors of endocannabinoid inactivation might target this channel (as it is likely the case of AM404) or enhancement of the AEA levels can induce TRPV1 activation. On the other hand, blockade of MAGL by JZL184 unleashes 2-AG, which binds preferentially to CB1 on GABAergic neurons. The resulting reduction in inhibitory tone causes an enhancement of the freezing response (Heldt et al, 2012). Surprisingly, despite the fear-promoting effects of the MAGL inhibitor, the contribution of 2-AG signaling to the sustained freezing responses appears to be negligible in vehicle-treated mice. Otherwise, one should have observed a reduction in freezing upon pharmacological blockade of CB1, which, however, was not the case. How to explain this apparent conundrum? 2-AG is predominantly synthesized in dendritic spines of excitatory synapses (Yoshida et al, 2006; Uchigashima et al, 2011; Suarez et al, 2011). The tight control of 2-AG signaling by rapid uptake and degradation by the proximal presynaptic terminals prevents the diffusion of 2-AG to CB1 on more distant GABAergic neurons (i.e. heterosynaptic signaling). Inhibition of 2-AG degradation enables the “spill-over” of 2-AG to GABAergic synapses, where it now exerts its fear-promoting effects overruling its potential fear-alleviating effects at glutamatergic synapses. In agreement with such a scenario, the fear-promoting consequences of CB1 activation on GABAergic neurons prevail if the brain is flushed with an exogenous CB1 agonist such as CP55,940. So far, this scenario is solely based on present and past studies on endocannabinoid regulation of freezing. It remains to be shown in the future whether it also applies to other fear responses, such as changes in vegetative parameters or flight behavior.

The exact modes of action of 2-AG vs. AEA are still far from being clear, including the brain structures involved. Nevertheless, the present study teaches a couple of important lessons regarding the future pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: 1) CB1 agonists bear the risk to promote rather than alleviate fear responses; 2) endocannabinoids are differentially involved in fear regulation with AEA attenuating fear, via CB1 on glutamatergic neurons, and 2-AG promoting fear via CB1 on GABAergic neurons. In consequence, a possible therapeutic strategy to increase extinction-related therapy efficiency could include the pharmacological increase of AEA signaling, while leaving 2-AG levels unaffected. This will be particularly challenging, given the multiple interactions between AEA and 2-AG (e.g. Maccarrone et al, 2008; Di Marzo, 2011). Pharmacological enhancement of AEA levels might be of interest for the treatment of psychiatric disorders which are associated with exaggerated fear, such as phobias, panic disorder and PTSD. The association between genetic polymorphisms in gene loci encoding for FAAH and CNR1 (i.e. CB1) and sustained fear and PTSD prevalence in humans (Hariri et al, 2009; Heitland et al, 2012; Pardini et al, 2012; Gunduz-Cinar et al, 2013; for review see Hillard et al, 2012) underscore the potential translational value of our preclinical findings and, thus, the suitability of such an approach.

Funding and Disclosure

The authors disclose any conflict of interest.

Acknowledgements

Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en salud (ISCIII y FEDER): Red de trastornos adictivos RD06/0001/1013 and RD2012/0028/0021; GRUPOS UCM-BSCH (GRUPO UCM 951579); Plan Nacional sobre Drogas: SAS/1250/2009. ALB received a travel grant from Boehringer Ingelheim Fonds. ALBT is supported by CNPq scholarship (process 290008/2009-3).

References

- Alger BE, Kim J (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci* 34(6): 304-315.
- Aliczki M, Zelena D, Mikics E, Varga ZK, Pinter O, Bakos NV, et al (2013). Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CD1 mice. *Horm Behav* 63(5): 752-758.
- Almeida-Santos AF, Gobira PH, Rosa LC, Guimaraes FS, Moreira FA, Aguiar DC (2013). Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 252: 10-17.
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, et al (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13(3): 281-283.
- Beltramo M, Piomelli D (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport* 11(6): 1231-1235.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, et al (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268(7): 1982-1989.
- Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, de la Torre R, Maldonado R, Ozaita A (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70(5): 479-486.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V (2000). Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483(1): 52-56.
- Di Marzo V (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14(1): 9-15.
- Di Marzo V, De Petrocellis L (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1607): 3216-3228.
- Di Marzo V, Piscitelli F, Mechoulam R (2011). Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb Exp Pharmacol*(203): 75-104.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121:149-158.
- Fowler CJ (2012). Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol Sci* 33(4): 181-185.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, et al (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 15(1): 64-69.

- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, et al (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30(6): 2017-2024.
- Golub Y, Mauch CP, Dahlhoff M, Wotjak CT (2009). Consequences of extinction training on associative and non-associative fear in a mouse model of Posttraumatic Stress Disorder (PTSD). *Behav Brain Res* 205(2): 544-549.
- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boschia F, et al (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20(2): 441-458.
- Gunduz-Cinar O, MacPherson KP, Cinar R, Gamble-George J, Sugden K, Williams B, et al (2013). Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol Psychiatry* 18(7): 813-823.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF (2004). CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol* 15(4): 299-304.
- Hariri AR, Gorka A, Hyde LW, Kimak M, Halder I, Ducci F, et al (2009). Divergent effects of genetic variation in endocannabinoid signaling on human threat- and reward-related brain function. *Biol Psychiatry* 66(1): 9-16.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007). Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* 27(5): 1211-1219.
- Heitland I, Klumpers F, Oosting RS, Evers DJ, Leon Kenemans J, Baas JM (2012). Failure to extinguish fear and genetic variability in the human cannabinoid receptor 1. *Transl Psychiatry* 2: e162.
- Heldt SA, Mou L, Ressler KJ (2012). In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. *Transl Psychiatry* 2: e181.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, et al (2010). Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20): 9406-9411.
- Hillard CJ, Weinlander KM, Stuhr KL (2012). Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience* 204: 207-229.
- Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, et al (2006). Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J Neurosci* 26(25): 6677-6686.
- Kamprath K, Plendl W, Marsicano G, Deussing JM, Wurst W, Lutz B, et al (2009). Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. *Genes Brain Behav* 8(2): 203-211.
- Kamprath K, Wotjak CT (2004). Nonassociative learning processes determine expression and extinction of

- conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11(6): 770-786.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, et al (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9(1): 76-81.
- Katona I, Freund TF (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14(9): 923-930.
- Kim J, Alger BE (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7(7): 697-698.
- Kinsey SG, O'Neal ST, Long JZ, Cravatt BF, Lichtman AH (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behav* 98(1): 21-27.
- Lafenêtre P, Chaouloff F, Marsicano G (2009). Bidirectional regulation of novelty-induced behavioral inhibition by the endocannabinoid system. *Neuropharmacology* 57(7-8): 715-721.
- Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, López-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, et al (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16(4): 624-637.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, et al (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5(1): 37-44.
- Luchicchi A, Pistis M (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Mol Neurobiol* 46(2): 374-392.
- Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, et al (2008). Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* 11(2): 152-159.
- Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, et al. (2006). Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 316(3): 969-382.
- Maione S, Costa B, Piscitelli F, Morera E, De Chiaro M, Comelli F, et al (2013). Piperazinyl carbamate fatty acid amide hydrolase inhibitors and transient receptor potential channel modulators as "dual-target" analgesics. *Pharmacol Res* 76C: 98-105.
- Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F, et al (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 27(4): 832-839.
- Marsicano G, Chaouloff F (2012). Moving bliss: a new anandamide transporter. *Nat Neurosci* 15(1): 5-6.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, et al (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418(6897): 530-534.

- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G (1996). Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53(3): 657-664.
- McKinney MK, Cravatt BF (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 74:411-432.
- Metna-Laurent M, Soria-Gómez E, Verrier D, Conforzi M, Jégo P, Lafenêtre P, et al (2012). Bimodal control of fear-coping strategies by CB₁ cannabinoid receptors. *J Neurosci* 32(21): 7109-7118.
- Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F (2013). Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther* 138(1): 18-37.
- Moreira FA, Aguiar DC, Terzian AL, Guimarães FS, Wotjak CT (2012). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience* 204: 186-192.
- Moreira FA, Wotjak CT (2010). Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2: 429-450.
- Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH (2007). Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)* 192(1): 61-70.
- Niyuhire F, Varvel SA, Thorpe AJ, Stokes RJ, Wiley JL, Lichtman AH (2007). The disruptive effects of the CB₁ receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. *Psychopharmacology (Berl)* 191(2): 223-231.
- Pan B, Wang W, Zhong P, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS (2011). Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 31(38): 13420-13430.
- Pardini M, Krueger F, Koenigs M, Raymont V, Hodgkinson C, Zoubak S, et al (2012). Fatty-acid amide hydrolase polymorphisms and post-traumatic stress disorder after penetrating brain injury. *Transl Psychiatry* 2: e75.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005). Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21(4): 1057-1069.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 62(4): 588-631.
- Plendl W, Wotjak CT (2010). Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. *J Neurosci* 30(14): 4990-4998.
- Ralevic V, Kendall DA, Jerman JC, Middlemiss DN, Smart D (2001). Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 424(3): 211-219.

- Rey AA, Purrio M, Viveros MP, Lutz B (2012). Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 37(12): 2624-2634.
- Riebe CJ, Pamplona FA, Pamplona F, Kamprath K, Wotjak CT (2012). Fear relief-toward a new conceptual framework and what endocannabinoids gotta do with it. *Neuroscience* 204: 159-185.
- Ross RA, Gibson TM, Brockie HC, Leslie M, Pashmi G, Craib SJ, et al. (2001). Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol* 132(3): 631-640.
- Schlosburg JE, Blankman JL, Long JZ, Nomura DK, Pan B, Kinsey SG, et al (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13(9): 1113-1119.
- Sciolino NR, Zhou W, Hohmann AG (2011). Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. *Pharmacol Res* 64(3): 226-234.
- Siegmund A, Langnaese K, Wotjak CT (2005). Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of alpha-synuclein. *Behav Brain Res* 157(2): 291-298.
- Siegmund A, Wotjak CT (2007). A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res* 41(10): 848-860.
- Suárez J, Ortíz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, et al (2011). Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience* 192: 112-131.
- Tambaro S, Bortolato M (2012). Cannabinoid-related agents in the treatment of anxiety disorders: current knowledge and future perspectives. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7(1): 25-40.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, et al (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65(3): 320-327.
- Terzian AL, Drago F, Wotjak CT, Micale V (2011). The Dopamine and Cannabinoid Interaction in the Modulation of Emotions and Cognition: Assessing the Role of Cannabinoid CB1 Receptor in Neurons Expressing Dopamine D1 Receptors. *Front Behav Neurosci* 5: 49.
- Trezza V, Campolongo P (2013). The endocannabinoid system as a possible target to treat both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Front Behav Neurosci* 7: 100.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, et al (2011). Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci* 31(21): 7700-7714.

- Wiskerke J, Irimia C, Cravatt BF, De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Pattij T, et al (2012). Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. *ACS Chem Neurosci* 3(5): 407-417.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, et al (2006). Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26(18): 4740-4751.
- Yoshino H, Miyamae T, Hansen G, Zambrowicz B, Flynn M, Pedicord D, et al (2011). Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. *J Physiol* 589(Pt 20): 4857-4884.
- Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Högestätt ED (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 396(1): 39-42.

Figure legends

Figure 1: *Pharmacological agonism and antagonism of CB1 increase, while CB2 blockade decreases, sustained freezing to the tone in response to a 1.5 mA fear conditioning, with no effects of CB2 activation and TRPV1 blockade.* Mice were assigned to 3 groups, which underwent a single tone-shock pairing with 0.5, 0.75 or 1.5 mA (d0). All mice were re-exposed to the tone for 3 min at d1, d2, d3 and d10 after conditioning. They were treated with saline (i.p.) 30 min before tone presentation (A). Mice underwent a single tone-shock (1.5 mA) pairing at d0, followed by re-exposure to the tone for 3 min at d1, d2, d3 and d10. At d1-d3, they were treated with (B) the TRPV1 receptor antagonist SB366791 (1 or 3 mg/kg), (C) the CB1 receptor antagonist/ inverse agonist SR141716 (3 mg/kg), (D) the CB2 receptor antagonist AM630 (3 mg/kg), (E) the CB1 receptor agonist CP55,940 (1 or 50 µg/kg), (F) the CB2 receptor agonist JWH133 (3 mg/kg, all i.p.), or vehicle 30 min before tone presentation at d1-d3. At d10, all mice were treated with vehicle. Note that SR141716 and AM630 were tested in the same experiment and, therefore, share the same vehicle control. Data (mean ± SEM, sample sizes in brackets) were analyzed and depicted in 20s bins; $x > y$ (e.g., III > I) – significant group differences ($p < 0.05$, ANOVA, followed by Newman-Keuls post-hoc test); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (significant group x time interval interaction, followed by Newman-Keuls test).

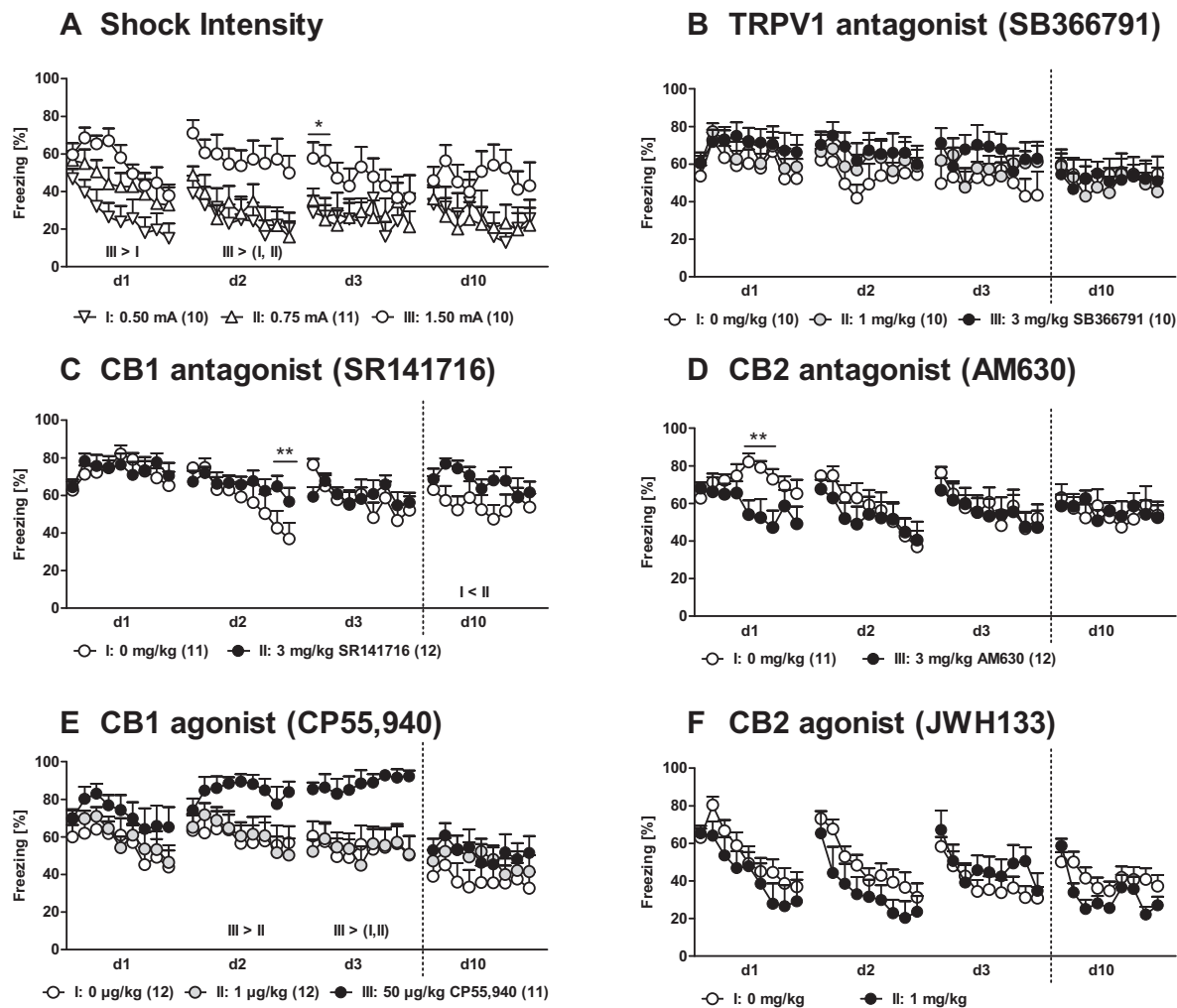
Figure 2: *Interference with endocannabinoid uptake and/or degradation has bidirectional effects on conditioned fear.* Mice underwent a single tone-shock (1.5 mA) pairing at d0, followed by re-exposure to the tone for 3 min at d1, d2, d3 and d10. At d1-d3, they were treated with (A) the endocannabinoid uptake inhibitor VDM11 (3 mg/kg), (B) the endocannabinoid uptake inhibitor/ TRPV1 agonist AM404 (3 mg/kg), (D) the FAAH inhibitor URB597 (0.3 or 1 mg/kg), (E) the FAAH inhibitor/ TRPV1 antagonist OMDM198 (1, 2.5 or 5 mg/kg), (F) the MAGL inhibitor JZL184 (4 or 8 mg/kg, all i.p.) or the respective vehicle solutions 30 min (A,B,C,E) or 2h (D,F) before tone presentation at d1-d3. (C) Mice received two vehicle injection, vehicle + AM404 (3 mg/kg), SR141716 (3 mg/kg) + AM404 (3 mg/kg; $n = 9$) or SB366791 (3 mg/kg) + AM404 (3 mg/kg; $n = 9$) 60 min/ 30 min before tone presentation at d1-d3. At d10, all mice were treated with vehicle. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. all other groups (for further details see legend of Fig. 1).

Figure 3: Conditional deletion of CB1 in GABAergic vs. glutamatergic neurons causes opposite changes in conditioned fear. (A) GABA-CB1-KO, (B) Glu-CB1-KO and their respective wild-type (WT) controls underwent a single tone-shock (1.5 mA) pairing at d0, followed by re-exposure to the tone for 3 min at d1, d2, d3 and d10. Each time they received a vehicle treatment 2h before tone presentation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT controls (for further details see legend of Fig. 1).

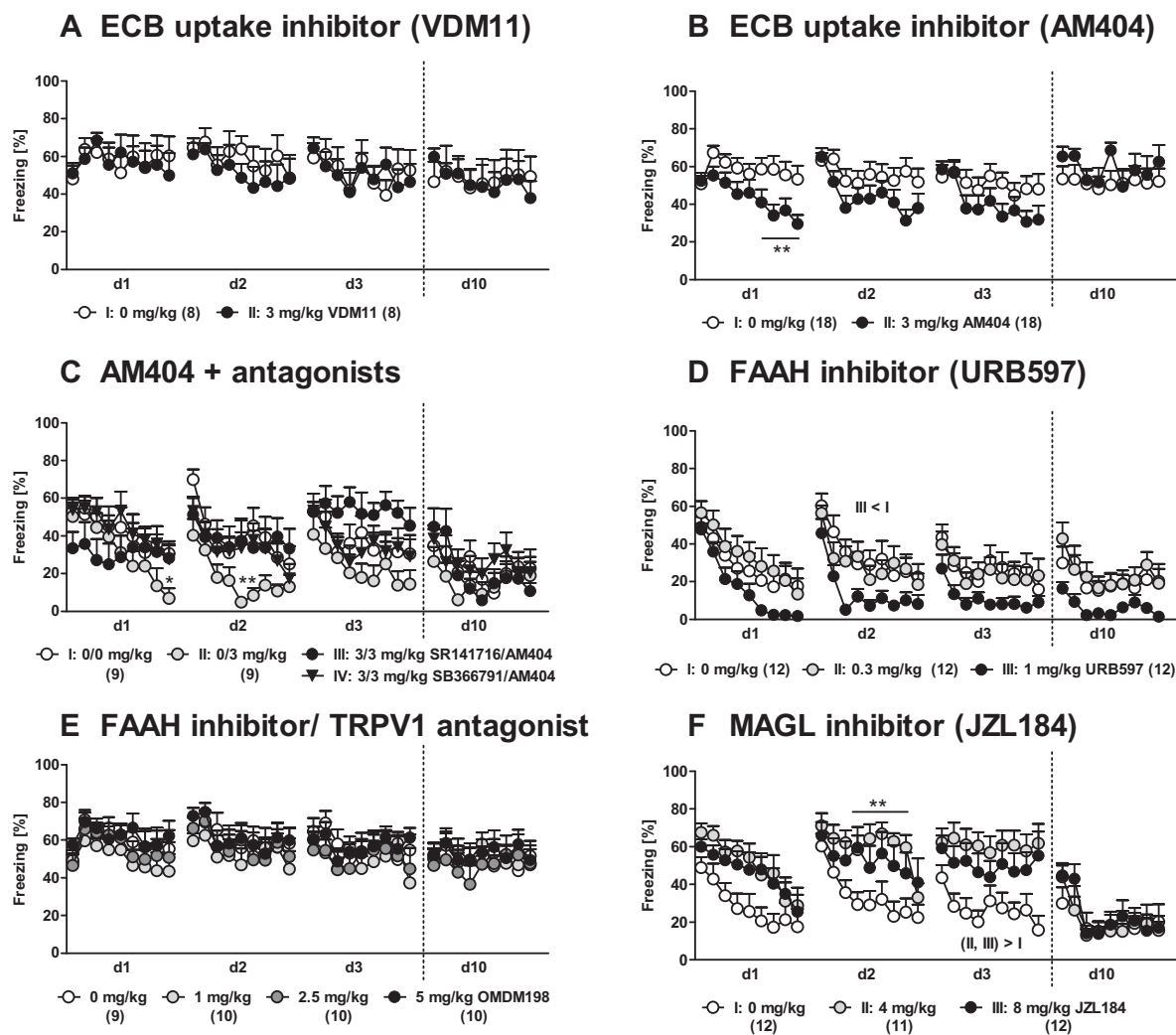
Figure 4: The fear-promoting effects of JZL184 are completely abolished in GABA-CB1-KO and Glu-CB1-KO. (A-C) GABA-CB1-KO ($n = 18$), (D-F) Glu-CB1-KO ($n = 9$) and their respective wild-type (WT) controls underwent a single tone-shock (1.5 mA) pairing at d0, followed by re-exposure to the tone for 3 min at d1, d2, d3 and d10. They were treated with vehicle or JZL184 (4mg/kg, all i.p.) 2h before tone presentation at d1-d3. At d10, all mice were treated with vehicle. Data were depicted in 20s bins (A,B,D,E) or averaged over the total 3min tone presentation (C,F). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle treatment (for further details see legend of Fig. 1).

Supplemental Figure 1: *Consequences of pharmacological treatment on locomotor activity in C57BL/6N mice.* The animals were treated in the same manner as done before re-exposure to the tone at d1-d3 (cf. Fig. 1 + 2), 16 days after fear conditioning. The following behavioral measures were scored during the subsequent 15-min exposure to the activity chambers and analyzed in 3-min bins: (i) movement time (left), distance (middle) and number of vertical explorations (rearings, right). I > II – significant group differences ($p < 0.05$, ANOVA, followed by Newman-Keuls post-hoc test); * $p < 0.05$ (significant group x time interval interaction, followed by Newman-Keuls test).

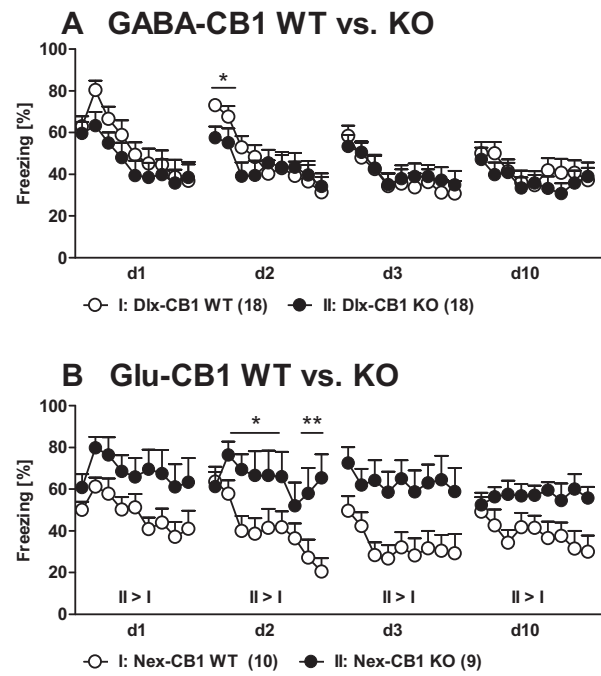
Supplemental Figure 2: *Consequences of JZL184 on locomotor activity in GABA-CB1-KO.* GABA-CB1-KO and WT controls were treated with JZL184 (4 mg/kg) or vehicle in the same manner as done before re-exposure to the tone at d1-d3 (cf. Fig. 4A-C), 16 days after fear conditioning. The following behavioral measures were scored during the subsequent 15-min exposure to the activity chambers and analyzed in 3-min bins: (i) movement time (left), distance (middle) and number of vertical explorations (rearings, right).



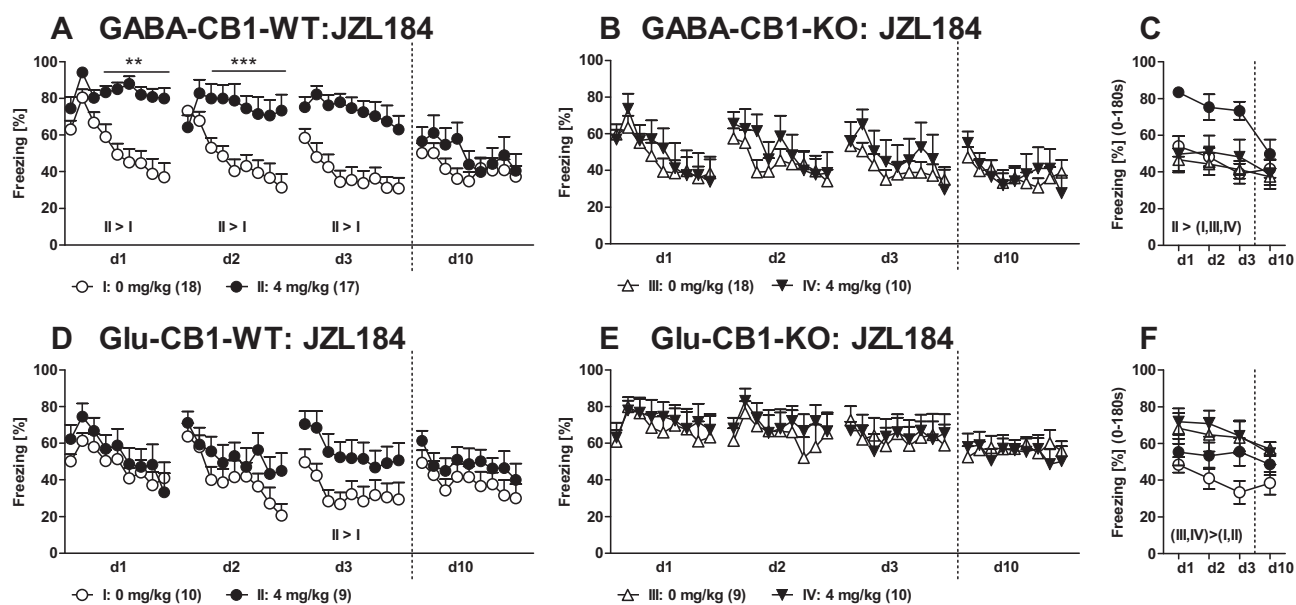
Llorente Berzal et al., Figure 1



Llorente Berzal et al., Figure 2



Llorente Berzal et al., **Figure 3**



Llorente Berzal et al., **Figure 4**

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES PARCIALES

El presente estudio se centró en investigar las consecuencias de un incremento, mediante métodos farmacológicos, de la señalización de AEA y 2-AG en la expresión del miedo condicionado. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la degradación de AEA reduce el *freezing*, conducta asociada al miedo en la que el animal se queda paralizado, mediante un mecanismo dependiente tanto del receptor CB1 como del TRPV1. La inhibición de la degradación de 2-AG, sin embargo, promueve el *freezing*, de una manera similar a la acción de un agonista del receptor CB1, y este efecto es dependiente de la expresión de receptores CB1 en neuronas GABAérgicas.

Para estudiar las consecuencias de la administración repetida de compuestos cannabinoides sobre la expresión de miedo condicionado, lo primero que hicimos fue establecer un protocolo de condicionamiento que provocara una respuesta de miedo, o *freezing*, sostenida, es decir, que no decayera a lo largo de las sesiones de extinción. Para ello, condicionamos a los animales (ratones C57Bl/6) con un *shock* eléctrico de 0,5, 0,75 ó 1.5 mA. Nuestros resultados demuestran que el grupo que recibió el *shock* de mayor intensidad exhibió una respuesta de miedo durante la extinción mayor que la de los otros grupos de animales. Por este motivo, en los consiguientes experimentos decidimos utilizar esta intensidad de *shock* durante el condicionamiento de los animales.

El siguiente paso fue el de conocer si el SEC y/o el sistema endovaniloide participaban en la respuesta de miedo sostenida obtenida en el anterior experimento. Para ello, administramos a los animales un antagonista de TRPV1 (SB366791; 1 y 3 mg/kg), un antagonista o agonista inverso del receptor CB1 (SR141716; 3 mg/kg) o un antagonista del receptor CB2 (AM630; 3 mg/kg) 30 minutos antes de comenzar la fase de extinción (del día 1 al 3 tras el condicionamiento). Observamos que el tratamiento con SB366791 no produjo ningún efecto sobre la respuesta de miedo condicionado, mientras que el tratamiento con SR141716 incrementó la respuesta de *freezing* de manera significativa el segundo día de tratamiento. Además, pudimos observar cierta persistencia de los efectos 10 días después del condicionamiento (en el que los animales sólo recibieron vehículo). Por último, el tratamiento con AM630 produjo una

disminución significativa del porcentaje de *freezing* el primer día de extinción, sin efectos durante los dos días siguientes.

El tratamiento de los ratones con una dosis baja del agonista del receptor CB1 CP-55,940 (CP; 1 µg/kg) no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de *freezing*. Sin embargo, una dosis mayor (50 µg/kg) provocó un aumento de la respuesta de miedo condicionado. Este efecto fue estadísticamente significativo el segundo y el tercer día de extinción. Con todo, no encontramos efectos persistentes por parte del tratamiento al no encontrar diferencias significativas a día 10 postcondicionamiento. Tampoco observamos ninguna alteración del miedo condicionado debida a la administración del agonista del receptor CB2 (JWH133; 3 mg/kg).

Para evaluar si el incremento de los niveles de cannabinoides endógenos provoca efectos similares a los observados con el CP, empleamos inhibidores de la recaptura e inhibidores de la degradación, tanto de AEA como de 2-AG, dos de los endocannabinoides mejor conocidos.

El tratamiento con VDM11 (3 mg/kg), un inhibidor de la recaptura de los endocannabinoides no produjo ningún efecto sobre las respuestas de miedo condicionado, sin embargo, el AM404, otro inhibidor de la recaptura, causó una disminución significativa de la respuesta de *freezing* en comparación con la respuesta sostenida que presentaron los grupos tratados con vehículo. Este efecto fue significativo a día 1 y 3 tras el condicionamiento, mientras que a día 2 sólo se observó una tendencia. Como se demuestra a través de la coadministración de los antagonistas tanto del receptor CB1 como del TRPV1, los efectos aliviadores del miedo observados por el tratamiento con AM404 dependieron de la señalización del receptor CB1 y del TRPV1 ya que tanto el SR141617 como el SB366791 bloquearon la disminución de la respuesta de miedo provocada por el AM404.

Se sabe que el AM404 produce un incremento de los niveles tanto de AEA como de 2-AG, así que, para verificar cuál de los dos ligandos endocannabinoides participa en tales efectos sobre la conducta de miedo, utilizamos un inhibidor de la FAAH, el URB597 (0,3 y 1 mg/kg). La dosis de 1 mg/kg consiguió disminuir el porcentaje de *freezing* de manera significativa 2 días después del condicionamiento, mientras que el

tercer día pudimos observar una tendencia en el mismo sentido. Los efectos aliviadores de la respuesta de miedo condicionado duraron hasta el día 10, es decir, fueron persistentes a pesar de la interrupción del tratamiento el día 3.

Además del URB597, también empleamos el OMDM198 (1, 2,5 y 5 mg/kg), un inhibidor de la FAAH además de antagonista de TRPV1. Sin embargo, los animales tratados con este compuesto cannabinoide no mostraron ninguna alteración de la respuesta de miedo.

Por último, estudiamos las consecuencias de un incremento de los niveles de 2-AG sobre la expresión de miedo. El tratamiento con el inhibidor de la MAGL (JZL184; 4 y 8 mg/kg) produjo un aumento significativo de la respuesta de miedo los 3 días siguientes al condicionamiento. No se encontraron diferencias significativas en los efectos de ambas dosis entre sí, pero la dosis de 4 mg/kg pareció ser más eficiente que la dosis de 8 mg/kg. No observamos efectos a largo plazo (a día 10) del tratamiento con JZL184.

El siguiente paso fue el de identificar la población neuronal involucrada en los efectos del JZL184. Con este fin tratamos ratones mutantes condicionales, con una deficiencia de expresión del receptor CB1 bien en neuronas glutamatérgicas corticales (Glu-CB1-KO) o bien en neuronas GABAérgicas (GABA-CB1-KO) con JZL184 (4 mg/kg). Los resultados demuestran la existencia de diferencias en la respuesta de miedo entre los grupos salvajes o *wild-type* y los grupos *knock-out* (KO). Los animales KO para el gen del receptor CB1 en terminales GABAérgicos mostraron una ligera menor respuesta de miedo condicionado que los animales con el fenotipo salvaje, significativa sólo el día 2 tras el condicionamiento. Sin embargo, los animales KO para el receptor CB1 en terminales glutamatérgicos exhibieron una mayor respuesta de *freezing* que sus compañeros *wild-type* a lo largo de todo el experimento. En los animales GABA-CB1-WT, el tratamiento con JZL184 provocó un aumento significativo de la respuesta de miedo, al igual que en los animales Glu-CB1-salvajes, aunque en estos últimos de manera menos pronunciada. En ninguno de los dos casos se observaron efectos perdurables a día 10. Los efectos del JZL184 se vieron completamente anulados en los animales GABA-CB1-KO. Tampoco obtuvimos diferencias significativas debidas al tratamiento en los animales Glu-CB1-KO. El último paso del presente análisis fue el de

estudiar las diferencias entre los dos genotipos (salvaje y KO) en los efectos del JZL184 a lo largo de los 3 días de extinción. Observamos, en los animales GABA-CB1-salvajes, que el tratamiento provocó un incremento significativo de la respuesta de miedo con respecto al grupo KO, en el cual el tratamiento farmacológico no provocó *a priori* ninguna alteración. En cuanto a los animales con una delección del gen para el receptor CB1 en terminales glutamatérgicos no encontramos ningún efecto significativo del tratamiento con el compuesto cannabinoide.

En lo que respecta a los efectos sobre la actividad locomotora, medida en el campo abierto y utilizando el mismo intervalo de tiempo entre la administración de los fármacos y el comienzo del test conductual al realizado durante las fases de extinción, pudimos observar lo siguiente:

- El tratamiento con AM404 causó un ligero aumento de la distancia recorrida, pero no del tiempo de movimiento.
- El tratamiento con VDM11 produjo una disminución significativa de la distancia recorrida y de la frecuencia de posturas erguidas
- Los animales GABA-CB1-KO mostraron una disminución de la actividad locomotora algo más pronunciada hacia el final de la prueba que los animales con fenotipo salvaje.

Estas alteraciones de la actividad locomotora observadas en estos grupos experimentales no son capaces de explicar por sí mismas las diferencias encontradas en las respuestas de miedo condicionado. En el caso de los animales tratados con SR141617, observamos una disminución significativa de la actividad motora tanto horizontal como vertical. Esta disminución de la actividad podría de alguna manera confundirse con el incremento del tiempo de *freezing* registrado en estos animales, una cuestión que no debemos descartar en relación a la posibilidad de que el bloqueo de los receptores CB1 provoque un incremento de la respuesta de miedo condicionado.

Gracias a los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que los endocannabinoides se encuentran diferencialmente involucrados en la regulación de las respuestas de miedo, siendo la AEA la que inhibe conductas asociadas al miedo y el 2-

AG el que promueve el *freezing*, acción que parece realizar a través de los receptores CB1 de los terminales GABAérgicos. En consecuencia, debería prestarse atención a la hora de incrementar selectivamente los niveles de endocannabinoides, intentando aumentar los de AEA sin modificar los de 2-AG. En esta misma línea, el incremento farmacológico de los niveles de AEA podría ser de gran interés para el tratamiento de trastornos psiquiátricos asociados a un miedo exagerado, tales como las fobias, el trastorno de pánico y el trastorno por estrés postraumático (PTSD, del inglés *Post-traumatic stress disorder*), lo cual supone un gran reto dadas las múltiples interacciones que existen entre la AEA y el 2-AG. La asociación entre polimorfismos genéticos en los loci FAAH y CNR1 (genes que codifican para FAAH y receptor CB1, respectivamente) y la prevalencia de PTSD en seres humanos resaltan el valor translacional de los descubrimientos preclínicos y, por tanto, la idoneidad de tal enfoque. Asimismo, el uso de agonistas exógenos del receptor CB1, como por ejemplo, el consumo de cannabis, conlleva el riesgo de promover las respuestas asociadas al miedo, lo cual concuerda con la relación existente entre el abuso de cannabis y la aparición de ataques de pánico.

DISCUSIÓN

1. EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y LA EXPOSICIÓN CRÓNICA DURANTE LA ADOLESCENCIA A UNA DROGA DE ABUSO

1.1. Consecuencias de la separación materna neonatal y la administración del agonista cannabinoide CP-55,940 en edad juvenil

Los resultados de este trabajo, en lo que se refiere a alteraciones conductuales y endocrinas indican que, en general, los efectos, tanto de la separación materna (SM) como de tratamiento adolescente con CP-55,940 (CP) fueron dependientes del sexo y que la combinación de ambos tratamientos no produjo una potenciación de efectos en las pruebas y valoraciones que realizamos.

La SM produjo un aumento en el comportamiento materno (frecuencia de *licking-grooming*) tras la reunión de la madre con sus crías. Hasta el momento actual, este parece ser el primer estudio que ofrece un análisis del comportamiento materno después de este tipo específico de SM. Este aumento del cuidado materno está en concordancia con otros estudios que emplean separaciones de la madre de sus crías de forma periódica (Macri *et al.*, 2004).

En la etapa adulta, las ratas macho SM, mostraron un aumento de tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado (LCE), lo que ha sido clásicamente interpretado como un indicador de efecto ansiolítico (Pellow y File, 1986). Sin embargo, tal comportamiento es también interpretable como un aumento del comportamiento de riesgo (Davis *et al.*, 2009; Löfgren *et al.*, 2006). Dado que otros índices de ansiedad, como el tiempo de permanencia en el interior del tablero con agujeros (TCA), no se vieron afectados por la SM, es a nuestro juicio más probable que el aumento del tiempo de permanencia en los brazos abiertos del LCE esté relacionado con un aumento del comportamiento de riesgo. Es más, anteriores estudios realizados por nuestro grupo han revelado que machos adolescentes sometidos a la SM mostraban una tendencia a una mayor impulsividad (Marco *et al.*, 2007).

En contraste con lo observado en otros estudios (Ellenbroek *et al.*, 1998, 2004; Ellenbroek y Cools, 2000, 2002; Husum *et al.*, 2002), la SM no produjo un déficit en el

test de la inhibición prepulso (PPI) en ninguno de los sexos. Datos previos indican que los cambios en la PPI producidos por la SM son específicos de cepa, y han sido observados en ratas *Wistar*, pero no en ratas *Lewis* o *Fischer 344* [Ellenbroek y Cools, 2000; ver también Choy *et al.* (2009) y Lehmann *et al.*, (2000) para resultados negativos en ratas *Wistar*]. Si bien, el presente trabajo se realizó con ratas *Wistar*, la existencia de diferentes proveedores y de distintas subcepas podrían ser factores adicionales susceptibles de ser tenidos en cuenta, como inductores de variación, a la hora de explicar los diferentes resultados. En nuestra opinión, es plausible que los efectos deletéreos que la SM *per se* pudiera haber ejercido sobre la PPI se hayan revertido de alguna manera por la importante manipulación diaria a la que los animales fueron sometidos para ser pesados e inyectados con el tratamiento farmacológico durante el periodo adolescente. Ha sido ya descrito que la manipulación de los animales durante el periodo adolescente tiene un efecto mayor sobre el comportamiento que la misma manipulación en la edad adulta (Maldonado y Kirstein, 2005). Es más, los efectos deletéreos del aislamiento social sobre la respuesta de PPI se revierten si se somete a los animales a un protocolo de manipulación post-destete (Rosa *et al.*, 2005; Krebs-Thomson *et al.*, 2001). Un factor adicional que debemos considerar es que el incremento del cuidado materno observado tras el periodo de SM pudiera haber contribuido a contrarrestar las consecuencias negativas de la SM en la capacidad de PPI. Como no se ha medido el comportamiento materno en estudios previos usando este procedimiento de SM no podemos dilucidar si el efecto compensador del aumento de comportamiento materno depende del tipo de cepa o subcepa de las ratas empleadas para el estudio. Todos estos factores podrían contribuir también a explicar por qué bajo las presentes condiciones no encontramos un incremento de la reactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en las ratas SM adultas. A pesar de que los efectos de la SM sobre el eje HHA no son consistentes (Lehmann y Feldon, 2000), algunos estudios con SM a día postnatal (DP) 9 mostraron un aumento de la respuesta de la corticosterona al estrés por inmovilización en ratas adultas (Lehmann *et al.*, 2002).

En línea con estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Llorente *et al.*, 2007) y de otros autores que emplean el presente procedimiento de SM (separación durante 24 horas de la madre de sus crías a DP 9) (Gruss *et al.*, 2008) nuestros resultados también muestran que la SM produce una disminución del peso corporal a largo plazo. Posiblemente existe una relación entre esta disminución de peso en ratas

adultas de ambos sexos sometidas a SM y sus bajos niveles de leptina plasmática. Estos datos en etapa adulta complementan resultados previos de nuestro laboratorio en los que ratas de 13 días de edad postnatal muestran igualmente niveles de leptina reducidos tras sufrir el mismo procedimiento de SM (Viveros *et al.*, 2009), lo que claramente indica que los cambios inducidos sobre esta hormona por la SM persisten a lo largo del tiempo.

Como cabía esperar, a partir de lo encontrado por otros autores (Arévalo *et al.*, 2001; McGregor *et al.*, 1996), la administración de CP produjo una disminución de la actividad motora tanto en machos como en hembras. Este efecto se detectó no sólo después de la primera exposición a la droga, sino también tras quince días de inyecciones diarias, lo que indica que no se desarrolló una tolerancia importante a este efecto del fármaco. El efecto del CP no persistió tras la interrupción del tratamiento y fue independiente de la SM, lo que sugiere que los efectos del CP no persisten en el tiempo, al menos 24 horas después de la última inyección de CP y que no existe una interacción de la SM con los efectos inhibidores de la actividad motora producidos por el agonista cannabinoide.

Nuestros resultados indican que las hembras tratadas con CP durante el periodo adolescente mostraron una disminución de la PPI en la etapa adulta (cuando la intensidad del prepulso fue de 80 dB), lo cual concuerda con resultados previos encontrados en machos después de un tratamiento peripuberal (Wegener y Koch, 2009; Schneider *et al.*, 2005; Schneider y Koch, 2003) con el agonista cannabinoide WIN55,212-2. Sin embargo, en nuestro caso, los machos tratados con CP no mostraron cambios en la PPI. Mientras que la PPI se ha visto afectada en las hembras, la amplitud del reflejo acústico basal no se ha visto alterado, lo que sugiere que en este test no se detectaron efectos ni de tipo ansiogénico ni de tipo ansiolítico del tratamiento evaluados mediante el análisis de la respuesta de sobresalto.

El tratamiento durante la adolescencia con el CP no alteró el comportamiento de los machos en el TCA en la edad adulta mientras que las hembras mostraron un aumento de comportamiento de exploración y una disminución del comportamiento de tipo ansiogénico (aumento de la ambulación interna en el campo abierto) lo que concuerda parcialmente con resultados previos de nuestro grupo obtenidos usando un tratamiento similar con el mismo agonista cannabinoide (Biscaia *et al.*, 2003).

En este estudio, el tratamiento con CP no produjo cambios en el comportamiento en el LCE ni en machos ni en hembras. En estudios previos, el tratamiento con CP durante el periodo adolescente incrementó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (pero no el porcentaje de entradas en los brazos abiertos) tanto en machos como en hembras (Biscaia *et al.*, 2003), mientras que otros autores no encontraron efectos a largo plazo en el comportamiento de los animales en el LCE después de un tratamiento con CP (Higueras-Matas *et al.*, 2009) u otros agonistas cannabinoides como el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Rubino *et al.*, 2008) durante la adolescencia. Existen varias diferencias en el procedimiento empleado, entre ellos la duración y el periodo del tratamiento administrado durante la adolescencia, el orden de las pruebas conductuales realizadas en la edad adulta y/o el intervalo de tiempo entre el final del tratamiento farmacológico y el comienzo de las pruebas, lo que podría explicar la diferencia de resultados entre unos experimentos y otros.

En conjunto, los datos de este trabajo sugieren que las hembras se han visto más afectadas que los machos por el tratamiento adolescente con CP en la PPI y en el TCA. Sin embargo, los machos parecen verse más afectados por el agonista cannabinoide en relación a la reactividad del eje HHA. De hecho, los machos tratados con CP mostraron una respuesta aumentada de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y corticosterona al test de la PPI, mientras que no se vio ningún efecto sobre estos parámetros en las hembras. En concordancia con estudios previos (Higuera-Matas *et al.*, 2009; Biscaia *et al.*, 2003) no se detectó ningún efecto del CP en los niveles basales de ACTH y corticosterona o en respuesta a un factor estresante de tipo medio como es el LCE, lo que indica que el efecto del agonista cannabinoide puede verse restringido a factores estresantes de mayor intensidad que la exposición a nuevos ambientes. Es por tanto posible que la administración durante la adolescencia de un agonista cannabinoide pueda producir efectos a largo plazo en la función del eje HHA de una manera sexo-dependiente. Se sabe que una administración crónica con CP en ratas adultas aumenta los niveles de ARNm del factor liberador de corticotropina (CRF, del inglés *corticotropin releasing factor*) en el núcleo paraventricular del hipotálamo 24 horas después de la última inyección (Corchero *et al.*, 1999), siendo ésta una estructura clave para la regulación del eje HHA [para más información ver Armario (2006)]. Además, la exposición crónica de ratas macho adultas a altas dosis del agonista cannabinoide HU-210 aumentó los niveles de corticosterona como respuesta a un estrés por

inmovilización el día después de la última inyección del fármaco (Hill y Gorzalka, 2006). Estas observaciones son compatibles con el hecho de que el sistema endocannabinoide (SEC) regula las respuestas neuroendocrinas al estrés (Gorzalka *et al.*, 2008). El estrés aumenta la sintomatología psicótica y, en pacientes esquizofrénicos, se ha visto un incremento de la función del eje HHA; incremento que es reducido tras la administración de antipsicóticos (Walker *et al.*, 2008). En su conjunto, estos datos apoyan la existencia de una relación entre el cannabis y las psicosis (Fernández-Espejo *et al.*, 2009), y la idea de que una administración crónica con un cannabinoide pueda representar un modelo animal adecuado para el estudio de la sintomatología psicótica inducida por cannabis.

De acuerdo con datos previos de nuestro grupo (Biscaia *et al.*, 2003), la administración de CP disminuyó la ganancia de peso durante el periodo que duró el tratamiento tanto en machos como en hembras. Efectos similares se han visto con distintos agonistas cannabinoides (Rubino *et al.*, 2008; López-Moreno *et al.*, 2004). Una parte importante de esta disminución en la ganancia de peso puede atribuirse a la típica reducción de ingesta observada tras la administración crónica del agonista cannabinoide (Biscaia *et al.*, 2003). La reducción de ingesta y de ganancia de peso tras un tratamiento crónico con un cannabinoide podría ser debida a la bien conocida regulación a la baja de los receptores CB1 que se observa en varias regiones cerebrales, incluyendo el hipotálamo (Sim-Selley, 2003; Romero *et al.*, 1998). Un factor adicional podría ser el estado aversivo causado por la administración aguda de la droga, fenómeno demostrado mediante técnicas de aversión de lugar condicionada (McGregor *et al.*, 1996).

La disminución del crecimiento somático se vio acompañada por una disminución a largo plazo de los niveles circulantes de leptina en machos. De hecho, los machos no-SM tratados con CP tenían niveles de leptina disminuidos de 30 a 33 días después del final del tratamiento, mientras que los niveles, ya reducidos, de esta hormona en los machos separados no disminuyeron aún más tras el tratamiento crónico con CP. En hembras, los niveles de leptina en plasma se redujeron debido a la SM, pero no debido al tratamiento crónico con CP. La ausencia de efecto del CP sobre los niveles de leptina en las hembras no-SM podría relacionarse con el bajo impacto relativo del CP en la ganancia de peso corporal en las hembras si las comparamos con los machos (7% frente al 20%). Lo mismo podría aplicarse a la falta de efectos adicionales en los niveles

de leptina producidos por el CP en las ratas macho separadas. A este respecto, merece la pena mencionar que existen múltiples evidencias que apuntan a la existencia de dimorfismos sexuales en cuanto a los mecanismos activados por los agonistas cannabinoides en relación a la regulación de la homeostasis energética (por ejemplo, ingesta de comida, metabolismo, temperatura corporal, interacciones con sustratos neurales implicados en la modulación del apetito) [para mayor información consultar Farhang *et al.* (2009)]. Es plausible que los efectos del CP sobre estos parámetros se relacionen con el papel del SEC en la regulación de la ingesta de comida y del balance energético (Bermúdez-Silva *et al.*, 2010; Viveros *et al.*, 2008). Es más, datos recientes de nuestro grupo indican que durante la adolescencia opera ya un sistema cannabinoide endógeno activo en cuanto a su implicación en la regulación del gasto energético y el metabolismo (Lamota *et al.*, 2008).

En cuanto a los efectos observados tras el análisis inmunohistoquímico de los cerebros de los animales empleados en esta parte de la Tesis, los resultados demuestran que tanto la SM como una exposición durante la adolescencia a un cannabinoide producen efectos a largo plazo sexo-dependientes sobre los niveles hipocampales de proteína glial fibrilar ácida (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), de receptores CB1 y de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*). Asimismo, se observaron en la capa de células polimórficas del giro dentado (GD) de las hembras adultas control unos mayores niveles basales de células GFAP+ que en la de los machos. Anteriormente, habíamos observado que a DP 13 las hembras control presentaban un mayor número de células GFAP+ que los machos control. Es más, también vimos que las hembras control mostraron un mayor número de células marcadas con Fluoro Jade-C (FJ-C) (i.e. neuronas en degeneración) que los machos control (Llorente *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que, a DP 13, las tasas de apoptosis “natural” y de proliferación de astrocitos podrían ser mayores en hembras que en machos. Potencialmente, estas diferencias en el desarrollo podrían estar involucradas en la generación de los dimorfismos sexuales observados en el presente estudio en animales adultos. La SM produjo, en machos, un aumento significativo del número de células GFAP+ en las áreas CA1 y CA3 y en la capa polimórfica del GD. En un estudio previo, este mismo protocolo de SM (24 h de SM a DP 9) causó un aumento significativo del número de células GFAP+ y FJ-C+ en el hipocampo a DP 13 (Llorente *et al.*, 2009). Los presentes resultados demuestran que los

efectos de la SM se mantienen a lo largo del tiempo. El tratamiento con CP también produjo, en machos control, no-SM, un aumento significativo del número de células GFAP+ en la capa polimórfica del GD.

La diferencia en el número de células inmunorreactivas para GFAP podría ser debida a los efectos causados por los tratamientos del presente diseño experimental durante el desarrollo sobre la diferenciación y la proliferación de astrocitos, o a la activación de astrocitos que previamente estuviesen en un estado quiescente. El aumento de la expresión de GFAP, así como el incremento del número de astrocitos inmunorreactivos para el GFAP han sido clásicamente considerados como marcadores de una gliosis reactiva asociada a modificaciones neurodegenerativas (Eng y Ghirnikar, 1994). Uno de los posibles cambios moleculares descritos en la reactividad de los astrocitos por Sofroniew (2009) es una regulación a la alza de la expresión de GFAP. Este efecto podría permitir la detección de astrocitos que de otra manera se mantendrían por debajo del umbral de detección en los animales control mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas. Por tanto, parte de las diferencias encontradas en el número de células inmunorreactivas para el GFAP podrían reflejar modificaciones en la reactividad de los astrocitos (más que en el número de astrocitos) en respuesta a muerte neuronal.

Estudios en seres humanos demuestran que los consumidores de cannabis en edad adolescente tienen una mayor probabilidad de consumir psicoestimulantes, alucinógenos u opioides que aquéllos que nunca han consumido cannabis antes (Fergusson *et al.*, 2006), y modelos experimentales han revelado que los cannabinoides podrían causar alteraciones neuronales persistentes que pueden alterar las características estimulantes o reforzantes de otras drogas de abuso (Ellgren *et al.*, 2007; Pistis *et al.*, 2004). Es interesante señalar la implicación de los astrocitos en el desarrollo de los efectos de recompensa y de la dependencia a drogas (Narita *et al.*, 2008). Así pues, podríamos especular que los cambios observados en el número de células GFAP+ hipocampales del presente estudio podrían estar relacionados con este fenómeno. Con respecto a esta relación, se ha visto que los endocannabinoides activan los mecanismos, en los que están implicados los sistemas de recompensa, para la alimentación y promueven la diferenciación astrocítica (Higuchi *et al.*, 2010).

Un análisis proteómico, mediante un gel de electroforesis en dos dimensiones, realizado sobre muestras de hipocampo tratadas con THC reveló que diversas proteínas

mostraron alteraciones persistentes en respuesta a la administración de THC. El mayor número de proteínas diferencialmente expresadas en ratas adolescentes pretratadas con THC comparado con ratas adultas pretratadas con THC sugieren que existe una mayor vulnerabilidad a los efectos a largo plazo del THC sobre el primer grupo de animales. Entre las proteínas diferencialmente expresadas en ratas adolescentes expuestas al THC se incluyen proteínas del citoesqueleto y otras proteínas estructurales, incluyendo la transgreлина-3 (NP25), α y β -tubulinas y la proteína básica de la mielina (MBP, del inglés *myelin basic protein*) (Quinn *et al.*, 2008). Esto podría estar relacionado con los cambios estructurales o de remodelación que ocurren tras la exposición adolescente a THC y concuerda con la observación de cambios en la citoarquitectura que ocurren debido a un tratamiento cannabinoide (Tagliaferro *et al.*, 2006) y con otros estudios que informan de una expresión alterada de las proteínas estructurales tubulina y actina (Wilson *et al.*, 1996; Tahir *et al.*, 1992). En resumen, las proteínas diferencialmente expresadas en el hipocampo de adolescentes pre-expuestos a THC tienen una variedad de funciones altamente relacionadas con el estrés oxidativo, la función mitocondrial y metabólica y la regulación del citoesqueleto. Los presentes resultados demuestran que la exposición durante la adolescencia a CP tendió a reducir la expresión de BDNF en las áreas CA1 y CA3 de las hembras, lo cual parece compatible con los resultados anteriormente expuestos. De hecho, el BDNF presenta importantes efectos sobre la función neuronal y la supervivencia y es importante en el mantenimiento de la morfología dendrítica y la función sináptica (Nagahara y Tuszynski, 2011). Por otro lado, la SM contrarrestó la influencia del CP y produjo un incremento del BDNF en las hembras. Existe cierta controversia en la bibliografía sobre los efectos en la edad adulta de diversos protocolos de SM sobre los niveles de expresión del BDNF hipocampal. Casi todos los estudios han descrito una disminución de los niveles de ARNm para BDNF o de la proteína (de Lima *et al.*, 2011; Aisa *et al.*, 2009; Lippmann *et al.*, 2007; Roceri *et al.*, 2002), en otros casos no se observaron alteraciones (Réus *et al.*, 2011; Choy *et al.*, 2008; Roceri *et al.*, 2004) e incluso se han llegado a detectar mayores niveles de la proteína de BDNF sin cambios en los niveles de su ARNm (Greisen *et al.*, 2005). En un estudio reciente (Marco *et al.*, 2013) observamos que, en edad adolescente, la SM *per se* producía una disminución de los niveles hipocampales de BDNF. Sin embargo, en este caso, la medida se realizó en la etapa adulta y los animales recibieron inyecciones crónicas, lo cual podría haber contribuido a contrarrestar los

efectos de la SM. También es plausible que el incremento de BDNF en la edad adulta se deba a efectos compensatorios.

En su conjunto, los resultados sugieren que los astrocitos hipocampales de los machos fueron más vulnerables que los de las hembras a los efectos de la SM y del tratamiento adolescente cannabinoide, lo que sugiere la existencia de mecanismos protectores en las hembras. Estudios previos en ratas adultas han identificado dimorfismos sexuales en los efectos del estrés sobre el hipocampo y la amígdala, siendo los machos más vulnerables que las hembras. Estas diferencias podrían depender de los efectos protectores de las hormonas gonadales circulantes de las hembras y/o de los efectos organizacionales de los esteroides gonadales durante el desarrollo (McEwen, 2007; Cooke *et al.*, 1998). Cabe destacar que se han observado dimorfismos sexuales en el modelo de esquizofrenia de lesión neonatal del hipocampo ventral, exhibiendo las ratas macho adultas unos déficits más prominentes de la conducta social, del auto-aseo o *grooming* y del aprendizaje en el laberinto de Morris que las hembras (Silva-Gómez *et al.*, 2003). Por tanto, los mecanismos neuroprotectores durante el desarrollo de las hembras podrían tener un correlato funcional a un nivel conductual a largo plazo. No podemos excluir que las diferencias sexuales observadas en el presente estudio sean indicativas de una diferente “temporalización” de los efectos a nivel celular de la SM y del CP en machos y hembras. Es más, nuestros resultados demuestran que existen diferencias en la vulnerabilidad de las diversas subregiones del hipocampo a ambos tipos de manipulaciones. Los resultados obtenidos en animales que recibieron ambos tratamientos, es decir, animales SM y tratados crónicamente con un agonista cannabinoide durante la adolescencia, demuestran la existencia de interacciones funcionales entre los dos tipos de manipulación. Por ejemplo, en el área CA3 y en la capa polimórfica del GD, el tratamiento con CP tendió a contrarrestar los efectos de la SM. Es interesante recalcar que ambos tratamientos, cuando se administraron por separado, causaron cambios en la misma dirección mientras que la combinación de ambas manipulaciones parece que produjo una “normalización”.

Otro hallazgo relevante del presente estudio es la aparición de diferencias sexuales en la inmunorreactividad al receptor CB1 entre los animales control (tratados con vehículo y no SM), exhibiendo las hembras una menor inmunorreactividad al receptor CB1 en diversas áreas de la formación hipocampal. Estudios previos usando

Western blot también mostraron una diferencia sexual en los niveles hipocampales del receptor CB1 observando unos mayores niveles de CB1 en los machos que en las hembras (Reich *et al.*, 2009). La SM produjo una disminución de la expresión de CB1 en los machos y en las hembras adultas. Anteriormente informamos de que este mismo protocolo de SM (24 horas de SM a DP 9) causaba a corto plazo (DP 13) una reducción de los receptores CB1 del hipocampo de machos, pero no de hembras. Los presentes datos demuestran que el efecto de la SM en los machos es persistente. Es más, mientras que las hembras no se vieron afectadas por la SM durante la infancia (DP 13) (Llorente *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2009), los animales hembra SM adultos muestran una disminución de la expresión hipocampal de CB1. Este hecho podría atribuirse al diferente perfil de desarrollo de los receptores CB1 hipocampales en ratas macho y hembra, lo que sugiere que una precisa interpretación de las diferencias sexuales, al menos para algunos parámetros, requiere una perspectiva amplia y dinámica más que una simple observación a una determinada edad. A su vez, la exposición adolescente a un cannabinoide causó, en los animales macho adultos no SM, una disminución general de la inmunorreactividad a CB1, más marcada en CA1 y en la capa polimórfica del GD. Esta disminución a largo plazo de la inmunorreactividad al receptor CB1 en los machos tratados con CP podría representar un mecanismo de adaptación, que no se encontraría presente en las hembras. Estos datos parecen concordar con los resultados conductuales observados en los mismos animales utilizados para este estudio indicados más arriba. Recordemos que las hembras se vieron más afectadas durante la etapa adulta por el tratamiento adolescente con el cannabinoide (reducción de la PPI de la respuesta al sobresalto y un aumento de las conductas de búsqueda de la novedad/exploración en el TCA). Los machos SM y tratados durante la adolescencia con CP mostraron una “normalización” de la expresión hipocampal de CB1. En línea con los resultados obtenidos con el GFAP, estos datos apuntan a la existencia de interacciones funcionales entre la SM neonatal y la exposición adolescente a un cannabinoide. En contraste con los efectos observados en los machos, las hembras no SM tratadas con CP tendieron a mostrar un incremento de la inmunorreactividad hipocampal por el CB1. En relación con este último resultado, recientemente se ha visto que un tratamiento crónico con THC durante la adolescencia interactuó con hormonas ováricas para producir trastornos conductuales persistentes en ratas hembra en una tarea operante con componentes de aprendizaje y de ejecución, y causó alteraciones persistentes en los niveles del receptor

CB1 medidos por *Western blot*. Un ejemplo de estos efectos interactivos tuvo lugar en el hipocampo donde la densidad del receptor CB1 aumentó significativamente debido a la administración de THC durante la adolescencia (resultado que coincide con nuestros datos) pero no se producía tal efecto si la administración de THC era precedida por una ovariectomía (Winsauer *et al.*, 2011), lo que indica que el efecto del THC sobre los receptores CB1 hipocampales requirió la presencia de hormonas ováricas.

En el presente estudio se han revelado un gran número de diferencias sexuales que merecen un comentario final. En la hipótesis organizacional-activacional de la diferenciación sexual, la exposición a hormonas esteroides durante periodos tempranos del desarrollo masculiniza o defeminiza los circuitos neurales (cambios estructurales), programando las respuestas conductuales a las hormonas durante la etapa adulta. Al llegar la pubertad y la maduración gonadal, las hormonas testiculares y ováricas actúan sobre los circuitos previamente diferenciados sexualmente para facilitar la expresión de conductas típicas de cada sexo (efectos activacionales) (Handa *et al.*, 2008; Schwarz y McCarthy, 2008). Más recientemente, se ha propuesto que la remodelación del cerebro adolescente se organiza una segunda vez mediante la actividad de hormonas esteroides durante la pubertad. Esta segunda oleada de organización cerebral podría reconstruir y refinar circuitos que hubieran sido diferenciados sexualmente durante el desarrollo neural temprano. Si, de hecho, la organización del comportamiento, dependiente de la actividad de los esteroides ocurre también durante la adolescencia, esto supondría una segunda ventana temporal crítica durante el desarrollo, la adolescencia, en la que efectos reestructurantes podrían conducir a una reorganización del cerebro y resultaría de gran interés redefinir de manera más exacta la existencia y duración de este período crítico (Schulz *et al.*, 2009). En lo que respecta al presente estudio, la administración adolescente de cannabis podría haber interferido con la segunda oleada de reorganización.

1.2. Modulación por parte de la separación materna temprana de la preferencia de lugar condicionada inducida por MDMA

Este estudio proporciona la primera evidencia de que un solo episodio de SM de 24 horas a DP 9 produce alteraciones sexo-dependientes a largo plazo en los efectos

conductuales y neuroquímicos de la exposición adolescente a 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). Los efectos reforzantes de la MDMA se vieron debilitados, los niveles de serotonina en el estriado y la corteza fueron menores, hubo un mayor marcaje de la expresión del receptor CB1 en el hipocampo, y los niveles circulantes de leptina tuvieron una tendencia a ser mayores en las ratas macho SM que en las ratas macho no-SM. No se observaron diferencias entre las hembras SM y no-SM con respecto a estos parámetros. No hubo efectos significativos de la SM sobre los niveles de corticosterona o el comportamiento emocional. Se encontraron diferencias sexuales en el paradigma de la preferencia de lugar condicionada (CPP, del inglés *conditioned place preference*) durante la adolescencia independientemente de si había o no había habido manipulación neonatal (las ratas hembra no mostraron CPP inducida por MDMA). De acuerdo con estudios previos, las hembras mostraron menos conductas relacionadas con la ansiedad en el campo abierto y menores niveles de leptina (Llorente *et al.*, 2011; Viveros *et al.*, 2010b) y mayores de corticosterona (Llorente *et al.*, 2007) que los machos durante la edad adulta.

Existen evidencias de que en los roedores adultos la SM reduce la sensibilidad a los efectos reforzantes de estimulantes, y de que, generalmente, estos efectos son mayores en machos (Moffet *et al.*, 2006; Campbell y Spear, 1999; Matthews *et al.*, 1999). Nuestros resultados apoyan esta idea, dado que los efectos gratificantes de la MDMA fueron menos pronunciados entre las ratas macho adolescentes SM. A pesar de que la adolescencia es un periodo de elevada sensibilidad a drogas de abuso (Schramm-Sapota *et al.*, 2009), en el momento de redactar esta Memoria sólo encontramos dos estudios sobre efectos a largo plazo de distintos procedimientos de SM sobre la vulnerabilidad a estas sustancias en roedores adolescentes. Ratas adolescentes macho separadas durante 3 horas entre los DP 2-14 no sufrieron cambios en la susceptibilidad al CPP producido por metanfetamina (Faure *et al.*, 2009), mientras que ratones macho adolescentes que habían experimentado un solo episodio de SM (24 horas entre los DP 12-13) mostraron una motivación alterada a la autoadministración de cocaína (Martini y Valverde, 2012). En particular, el tiempo requerido para lograr la adquisición de la autoadministración fue significativamente más largo y los valores del punto de corte en un calendario progresivo fueron significativamente menores entre los ratones adolescentes SM. Es más, los animales SM también mostraron comportamientos de tipo depresivo y conductas relacionadas con la ansiedad y menores niveles de BDNF en la

amígdala y el hipocampo, estructuras cerebrales asociadas con procesos emocionales y cognitivos. Los autores de este estudio argumentaron que la SM podría dar lugar al desarrollo de anhedonia, lo que a su vez podría estar relacionado con la alteración descrita en la motivación por el consumo de cocaína (Martini y Valverde, 2012). Nuestros resultados se suman a esta línea de evidencia, demostrando por primera vez que la SM causa una alteración en los efectos gratificantes de la MDMA en ratas macho adolescentes. De manera interesante, hemos reportado con anterioridad que las ratas adolescentes sometidas a nuestro protocolo de SM exhiben menores niveles de BDNF hipocampal (Marco *et al.*, 2013) y conductas de tipo depresivo en la prueba de la natación forzada (Llorente *et al.*, 2007).

Cabe destacar que, en la etapa adulta, los machos SM, en los que los efectos gratificantes de la MDMA fueron menos marcados, mostraron unos niveles menores de serotonina que los machos no-SM en el estriado y la corteza. Como en el CPP, estos efectos fueron sexo-dependientes, puesto que no se observaron cambios en las hembras. Estos resultados concuerdan con aquéllos de estudios previos de nuestro laboratorio que revelaron diversas diferencias sexuales en los efectos de la SM, siendo los machos más vulnerables al evento neonatal adverso (Llorente-Berzal *et al.*, 2012; Llorente *et al.*, 2011; Viveros *et al.*, 2009), así como con el primer capítulo de la discusión de la presente Tesis Doctoral. El sistema serotoninérgico parece estar relacionado con los efectos gratificantes o de refuerzo positivo de la MDMA, dado que los antagonistas de serotonina bloquean la CPP causada por MDMA. Además, la MDMA actúa principalmente liberando serotonina de terminales sinápticos serotoninérgicos (Schmidt *et al.*, 1987), lo que eventualmente causa una pérdida persistente de neuronas serotoninérgicas funcionales y una reducción de los niveles de serotonina y de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Sarkar y Schmued, 2010; Battaglia *et al.*, 1987). Estudios previos han demostrado que diferentes protocolos de SM pueden causar alteraciones en el sistema serotoninérgico cerebral, tales como una disminución de los niveles de serotonina en el estriado ventral (Kosten *et al.*, 2004), niveles elevados de receptores hipocámpales 5-HT1A y 5HT1B y receptores corticales 5-HT2 y una disminución de los niveles de receptores 5-HT1A en el núcleo del rafe (Vázquez *et al.*, 2002), y niveles elevados de serotonina en la amígdala (Vicentic *et al.*, 2006). Es posible que la reducción de los niveles de serotonina en la corteza y el estriado observada en los

machos SM del presente estudio esté funcionalmente relacionada con la respuesta alterada del CPP inducido por MDMA en estos animales.

Decidimos evaluar la expresión del receptor CB1 en el hipocampo porque se ha demostrado que un tratamiento crónico con MDMA aumenta su expresión en esta región cerebral (Nawata *et al.*, 2010) y también porque los receptores CB1 hipocampales juegan un papel en la adquisición de la CPP (Zarrindast *et al.*, 2007). Es más, en el estudio anterior demostramos que la SM produce una disminución de la expresión del receptor CB1 en el hipocampo. Aquí, hemos observado que la expresión de los receptores cannabinoides CB1 en el hipocampo es mayor en los machos SM cuando se comparan con la de los machos no-SM. Puesto que en este estudio todos los animales fueron tratados con MDMA, los mayores niveles de receptores CB1 hipocampales pueden ser una consecuencia de las interacciones funcionales entre la SM y la MDMA en este sexo. Una posibilidad es que la sobreexpresión de receptores CB1 debilite los efectos gratificantes de la MDMA; resultados previos han mostrado que la estimulación de los receptores CB1 con altas dosis del agonista de CB1 WIN55,212-2 redujo la CPP inducida por MDMA en ratones (Manzanedo *et al.*, 2010). Es más, los ratones tratados con MDMA y WIN55,212-2 presentaron menores niveles de serotonina cortical, un efecto que podría también relacionarse con la falta de efectos gratificantes de la MDMA. A este respecto, recordemos que en el presente estudio hemos observado una disminución de la serotonina cortical en las ratas macho SM (que, como el resto de los animales fueron expuestas a MDMA). No podemos excluir que el incremento de los receptores CB1 hipocampales haya afectado al aprendizaje y a la memoria de los animales. Es posible que las ratas SM condicionadas con MDMA hayan mostrado déficits en el aprendizaje que hayan interferido con la adquisición de la CPP. Un estudio reciente demostró que el síndrome de abstinencia a MDMA produce una alteración en la memoria de reconocimiento en ratas, lo que podría ser el resultado de la activación de receptores CB1 en el hipocampo (Nawata *et al.*, 2010). Existen interacciones funcionales entre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide. En particular, los endocannabinoides inhiben la transmisión sináptica excitatoria a las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe a través de la activación de receptores CB1 presinápticos [ver para revisión Haj-Dahmane y Shen (2011)]. Así, la disminución de los niveles de serotonina en ratas macho SM podría estar relacionada con el aumento de la expresión de receptores CB1 observada en estos animales.

También evaluamos los niveles de leptina, dado que se ha demostrado que los receptores de leptina se expresan en regiones extrahipotalámicas importantes para la modulación de los efectos gratificantes y de la adicción a drogas, como por ejemplo neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral que proyectan hacia el núcleo accumbens (Fulton *et al.*, 2006). Hemos observado una fuerte tendencia hacia un aumento de los niveles circulantes de leptina en animales macho SM tratados con MDMA con respecto a los machos no-SM también tratados con la droga. Este efecto no puede atribuirse exclusivamente a nuestro protocolo de SM, dado que, tanto en el primer capítulo de la discusión como en otros trabajos de nuestro grupo, hemos demostrado que la SM, *per se*, produce una disminución de los niveles circulantes de leptina a largo plazo (Viveros *et al.*, 2009, 2010a, 2010b). Kobeissy *et al.* (2008) informaron que una administración aguda de MDMA producía una disminución de los niveles circulantes de leptina a corto plazo. Sin embargo, las consecuencias a largo plazo de un tratamiento con MDMA sobre esta hormona no han sido estudiadas. Nuestros resultados sugieren que la combinación de la SM con la exposición adolescente a MDMA podría dar lugar a interacciones entre ambos tratamientos que, en último término, dieran lugar al pequeño aumento de los niveles de leptina en machos SM. Es más, dado que la leptina parece reducir la motivación para conseguir la recompensa (Davis *et al.*, 2011), podemos especular que su aumento en los machos SM que fueron tratados con MDMA está relacionado con la ausencia de CPP de estos animales.

Bajo las presentes condiciones también se observaron diferencias sexuales entre las ratas no-SM relacionadas con las propiedades gratificantes de la MDMA, el comportamiento en el campo abierto y los niveles hormonales. Primero, la dosis de MDMA empleada produjo CPP en machos pero no en hembras. Un gran número de estudios demuestran que la MDMA produce CPP en ratones (Daza-Losada *et al.*, 2007; 2011; Manzanedo *et al.*, 2010) y ratas (Catlow *et al.*, 2010; Braidá *et al.*, 2005; Cole y Sumnall, 2003; Bilsky y Reid, 1991; Schechter, 1991) macho. Sin embargo, al menos en el tiempo de publicación de esta Tesis Doctoral, no encontramos ningún estudio que hubiera testado los efectos de refuerzo de la MDMA en ratas hembra en el paradigma de la CPP. Datos anteriores obtenidos con otros psicoestimulantes como la cocaína o la anfetamina sugieren que las hembras son más sensibles a estas drogas que los machos (Segarra *et al.*, 2010; Silverman y Koenig, 2007). De manera opuesta, en el presente

estudio hemos observado que la MDMA no indujo CPP en ratas adolescentes hembra a la dosis a la que fue efectiva en sus homólogos macho. Ciertamente, empleamos una dosis baja de MDMA. Probablemente, con una dosis mayor, las ratas hembra habrían desarrollado CPP, pero hubiera sido más difícil detectar el efecto de la SM. En línea con nuestros resultados, se ha visto que los machos adolescentes son más sensibles que las hembras a los efectos locomotores e hiperpiréticos de la MDMA, lo cual contrasta con estudios previos sobre dimorfismos sexuales en los efectos de otros psicoestimulantes (Koenig *et al.*, 2005). De acuerdo con una explicación dada por Koenig *et al.* (2005), la mayor sensibilidad de los machos adolescentes podría ser debida a una sobreproducción transitoria de receptores dopaminérgicos D1 y D2. Andersen *et al.* (1997) observó que entre los DP 25 y 40, la producción en el estriado de receptores D1 y D2 estaba aumentada en un 65% y un 144%, respectivamente, en machos (*versus* un 35% y un 31% en hembras). Las diferencias sexuales en la farmacocinética de la MDMA (Fonsart *et al.*, 2009) podrían también contribuir al hecho de que nuestras hembras no mostraran una CPP inducida por MDMA. También se han encontrados diferencias sexuales en la respuesta a MDMA en humanos, exhibiendo las mujeres consumidoras un mayor número de efectos negativos que los hombres (Verheyden *et al.*, 2002; Liechti *et al.*, 2001). Nuestros resultados sugieren que los machos experimentan más efectos positivos tras el consumo de MDMA que sus homólogas hembras, lo cual podría explicar el mayor índice de consumo entre jóvenes y adolescentes del género masculino. En segundo lugar, en el campo abierto, los machos pasaron más tiempo en la periferia del aparato y realizaron un menor número de *rearings* (actividad vertical, exploración) que las hembras. Las ratas muestran tigmotaxis – tienden a ambular cerca de las paredes del aparato dado que tienen aversión a los espacios abiertos – y se piensa que un aumento de la tigmotaxis es indicativo de una elevada emocionalidad (Gray, 1987; Valle y Bols, 1976). Los presentes resultados están en concordancia con casi toda la literatura relacionada con diferencias sexuales en el campo abierto, lo cual indica que las ratas hembra son más activas y muestran menores niveles de “emocionalidad” que los machos (Krokras *et al.*, 2012; Gray, 1987). Es improbable que los efectos observados sean debidos a los efectos residuales de la MDMA, dado que la droga fue administrada por última vez 20 días antes de realizarse el campo abierto. Es más, en contraste con el aumento de tigmotaxis observado en machos en nuestro estudio, una administración aguda de MDMA aumentó la tigmotaxis en hembras (Páleníček *et al.*, 2005). En tercer

lugar, las hembras mostraron mayores niveles de corticosterona y menores niveles de leptina que los machos, una diferencia sexual que previamente hemos descrito en capítulos anteriores de la presente Tesis Doctoral. Las diferencias sexuales en los niveles de leptina probablemente reflejen las acciones e interacciones de los esteroides sexuales (estrógeno y testosterona), pero todavía no está claro cómo están mediados tales efectos (Viveros *et al.*, 2010b; Smith y Waddell, 2003). Un factor que parece claro es que, en ratas, son los machos los que tienen más tejido adiposo, al contrario que en humanos (en los que las mujeres muestran niveles más elevados de leptina). Teniendo en cuenta que como hemos reiterado todos los animales de este estudio fueron expuestos a MDMA, los resultados indican que la droga no fue capaz de revertir los dimorfismos sexuales en los niveles de hormonas así como tampoco lo hizo el protocolo de SM. Es posible que los menores niveles de leptina en las hembras contribuyeran a la falta de respuesta que presentaron en el paradigma del CPP tras la administración de MDMA, dado que se ha visto que ratones sin receptores de leptina tienen una menor respuesta locomotora a la anfetamina y no desarrollan sensibilización locomotora tras la administración repetida de esta droga (Fulton *et al.*, 2006).

1.3. Cambios en la expresión y funcionalidad de los receptores CB1 en el cerebro y la expresión del receptor CB2 en tejido inmune como consecuencia de la separación materna y una exposición adolescente a cocaína

Uno de los aspectos más novedosos de este estudio es que analizamos en numerosas áreas cerebrales no sólo densidad sino también actividad de los receptores CB1 y los resultados obtenidos señalan las diferencias observables en ambos aspectos y cómo su estudio complementario puede aclarar mucho más las consecuencias de un determinado tratamiento así como las diferencias sexuales basales en los animales controles. Como se deduce de nuestros datos, densidad y actividad son diferencialmente afectados y el estudio únicamente de la expresión de la proteína puede ocultar datos importantes. Otro aspecto importante es el análisis de receptores CB2 en tejido inmunitario. En general, los resultados demuestran que la SM produce efectos a largo plazo en los receptores cannabinoides tanto a nivel central como periférico. La administración de cocaína modificó los receptores cannabinoides de manera sexo- y

región-dependiente, y ciertos efectos de la cocaína se vieron modulados por los eventos neonatales.

Antes de pasar a discutir los efectos de los tratamientos empleados, nos referiremos a los dimorfismos sexuales observados en la densidad y funcionalidad de los receptores CB1 cerebrales. Como ya ha sido descrito por otros autores [ver para revisión Craft *et al.* (2012) y Fattore y Fratta, (2010)], encontramos diferencias en el SEC cerebral entre los animales control macho y hembra. Recordemos que en el estudio que constituye el primer capítulo de esa Tesis ya describimos (como hemos discutido más arriba) diferencias sexuales en cuanto a la densidad de receptores CB1 en la formación hipocampal mediante técnicas de inmunohistoquímica. En el presente estudio también encontramos una menor densidad de receptores CB1 en el hipocampo de las hembras pero, además, hemos podido observar una mayor tasa de funcionalidad cuando los comparamos con los machos; como ya informamos en otro trabajo de nuestro grupo (Mateos *et al.*, 2010). Además en este caso, al analizar diversas regiones cerebrales más, hemos podido mostrar también estos dimorfismos sexuales en córtex prefrontal, caudado putamen y globo pálido. La expresión de los receptores CB1 fue también menor en la sustancia negra de las hembras comparadas con los machos, y se encontraron unos mayores niveles de funcionalidad del receptor CB1 en el núcleo accumbens, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo de los animales hembra comparadas con los machos. Tanto la expresión como la funcionalidad de los receptores CB1 son menores en el área tegmental ventral de las hembras comparadas con los animales macho, lo cual podría interpretarse como el sustrato neural de las diferencias sexuales que existen en los efectos de recompensa de los cannabinoides (Craft *et al.*, 2012). En general, las diferencias sexuales en la expresión y funcionalidad de los receptores CB1 en el cerebro sugieren una maduración diferencial del SEC en machos y en hembras que puede ser la responsable de las diferencias fisiológicas entre ambos sexos así como de las ya previamente reportadas diferencias sexuales en la respuesta a cannabinoides exógenos (Craft *et al.*, 2012; Fattore y Fratta, 2010).

Por lo que se refiere a los efectos de los tratamientos, comenzaremos por referirnos a los de la SM. En estudios previos, hemos descrito que la SM produce cambios a corto plazo sobre el SEC (Suárez *et al.*, 2009, 2010; Llorente *et al.*, 2008) y los presentes resultados demuestran la existencia de efectos a largo plazo observables en

la etapa adulta. En concreto, la SM causó un aumento de la expresión de receptores CB1 en la sustancia negra tanto de animales macho como de animales hembra. Entre los machos, la SM produjo también una disminución significativa de la funcionalidad del receptor CB1 en el núcleo accumbens, el córtex prefrontal y el hipotálamo, así como una reducción de la expresión del receptor CB1 en el tálamo. La actividad del receptor CB1 sólo se vio incrementada en el cerebelo de los machos adultos. Por otro lado, en las hembras, la SM produjo un aumento de la expresión del receptor CB1 en el cerebelo y un aumento de su funcionalidad en la sustancia gris periacueductal. Los cambios descritos en la expresión y funcionalidad de los receptores CB1 cerebrales podrían estar relacionados, al menos en parte, con los cambios conductuales provocados por la SM. El incremento generalizado de la expresión del receptor CB1 en la sustancia negra podría relacionarse con los efectos motores de la SM (Marco *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2009; Ellenbroek *et al.*, 2005). La disminución de la funcionalidad del receptor CB1 en el córtex prefrontal podría mediar los déficits cognitivos observados en los animales SM (Marco *et al.*, 2013; Llorente-Berzal *et al.*, 2012; Llorente *et al.*, 2011), mientras que la reducción en la funcionalidad de los receptores CB1 en el núcleo accumbens podría relacionarse con los síntomas depresivos (Macri y Laviola, 2004) y con la falta de motivación por la búsqueda de cocaína recientemente descrita en ratones macho SM (Martini y Valverde, 2012). Por su parte, los cambios hipotalámicos en la funcionalidad del receptor CB1 podrían reflejar alteraciones en la homeostasis energética y el eje HHA (Viveros *et al.*, 2009, 2010b; Marco *et al.*, 2009; Llorente *et al.*, 2008; Ellenbroek *et al.*, 2005). Entre las hembras, el aumento de la funcionalidad del receptor CB1 en la sustancia gris periacueductal podría reflejar las diferencias sexuales provocadas por la SM sobre la nocicepción; donde la alodinia mecánica y el dolor neuropático resultante de la SM fueron más marcados en hembras comparadas con machos (Burke *et al.*, 2013).

En cuanto a los efectos del tratamiento con cocaína durante la adolescencia, en machos encontramos una disminución de la expresión de receptores CB1 en el córtex prefrontal. Otros autores han descrito una disminución de los niveles de ARNm para el receptor CB1 en ratas macho adultas tratadas crónicamente con cocaína, en ausencia de cambios en la densidad del receptor (Gonzalez *et al.*, 2002b). Discrepancias entre ambos estudios podrían deberse a diferencias en la edad de administración de cocaína, en la dosis y el horario de administración de la droga, y lo que es más importante, en las

diferencias en la duración del periodo de abstinencia dado que se han visto diferencias entre los efectos a largo plazo de la cocaína y los efectos observados inmediatamente después del tratamiento, llegando éstos incluso a ser opuestos (Pickens *et al.*, 2011). El tratamiento con la droga produjo un aumento de la funcionalidad del receptor CB1 en el área tegmental ventral, el hipocampo, el caudado putamen y el globo pálido de animales macho, y un incremento similar en el globo pálido y el tálamo de hembras. Estos cambios podrían asociarse con las respuestas locomotoras producidas por la cocaína ya que se han visto relacionados los receptores CB1 del estriado con este fenómeno (Corbille *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado una disminución de la funcionalidad del receptor CB1 en la sustancia negra de los animales macho. Estudios previos han descrito que no hay cambios en los niveles de endocannabinoides cerebrales tras la autoadministración de cocaína (Caille *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2002a). Sin embargo, dado que existen abundantes interacciones entre los endocannabinoides y la neurotransmisión dopaminérgica (Fernandez-Ruiz *et al.*, 2010; Wiskerke *et al.*, 2008), los presentes cambios en la densidad y funcionalidad de los receptores CB1 podrían deberse a cambios sobre los niveles de dopamina inducidos por la cocaína. De hecho, la mayoría de las áreas cerebrales afectadas por la administración durante la adolescencia de cocaína son parte de las vías dopaminérgicas mesocorticolímbica y nigroestriatal. Es más, se ha visto que en hembras, el tálamo, un importante nódulo de integración con abundantes conexiones con áreas cerebrales dopaminérgicas (Smith *et al.*, 2009), se ve afectado por la administración durante la adolescencia de cocaína.

La combinación de ambos tratamientos, i.e. SM y administración de cocaína durante el período adolescente, produjo una disminución de la funcionalidad del receptor CB1 en la amígdala tanto de animales macho como de animales hembra. Entre las hembras, la combinación de ambos tratamientos incrementó la funcionalidad de los receptores CB1 en la sustancia negra y el cerebelo, y este mismo patrón se observó en el tálamo de los machos. Podemos destacar que en el tálamo y la sustancia gris periacueductal de las hembras, la aplicación de ambas manipulaciones normalizaron los niveles de actividad de los receptores CB1, al igual que en el caudado putamen de los animales macho, y levemente en el área tegmental ventral. Es a nuestro juicio interesante señalar aquí que también en el estudio de los efectos de la combinación de la SM con un tratamiento con el agonista cannabinoide, expuesto al principio de esta Discusión, los animales macho que recibieron los dos tratamientos mostraron una cierta

“normalización” de la expresión de CB1 en el hipocampo. Es más, también en el estudio sobre la influencia de la SM en los efectos de la MDMA los datos sugieren (aunque en ese caso de forma indirecta) interacciones funcionales entre ambos tratamientos. Por tanto, todos los datos indican que, efectivamente, al menos para ciertos parámetros de los que hemos estudiado y particularmente en los que se refiere al SEC, la SM interacciona con diferentes drogas de abuso tanto cannabinoides como no cannabinoides. En un sentido más amplio podemos interpretar que la exposición a un evento estresante durante edades tempranas de la vida puede potencialmente modular los efectos de la exposición a drogas de abuso durante la adolescencia.

Respecto a los efectos de los tratamientos sobre la expresión del receptor CB2 a nivel periférico, la SM produjo un incremento persistente de expresión de receptores CB2 en el bazo sin modificar su expresión en la médula ósea. Dado que los receptores CB2 median efectos inmunodepresores [ver para revisión Pacher *et al.* (2011)], el incremento observado en el bazo podría contribuir a la alteración de la función inmune previamente descrita en los animales SM (De la Fuente *et al.*, 2009; Llorente *et al.*, 2007). Sin embargo, son necesarios más experimentos para explicar cómo la administración adolescente de cocaína puede prevenir este efecto de la SM. Por otro lado, en el presente estudio, la cocaína causó una reducción generalizada de la expresión de receptor CB2 en médula ósea. Este resultado contrasta con estudios previos en los que se ha encontrado un incremento de la expresión de receptor CB2 en distintas células del sistema inmune tras la autoadministración de cocaína (Assis *et al.*, 2011); estas discrepancias pueden deberse a las diferencias en el protocolo de administración (inyección intraperitoneal frente a autoadministración), y/o a los diferentes efectos de la cocaína sobre distintos tejidos. Además, no se pueden excluir fluctuaciones en los niveles de expresión de receptor CB2 en los tejidos inmunes tras la administración de cocaína y un periodo de abstinencia, que podrían mediar, al menos en parte, en la funcionalidad alterada encontrada tras la administración de cocaína (Fox *et al.*, 2012; Cabral, 2006).

Por último, cabe destacar que mientras otros estudios han mostrado que la administración de cocaína redujo la ganancia de peso corporal en los adultos (Laviola *et al.*, 1995) y adolescentes administrados con mayores dosis de la droga (10 mg/kg, dos veces al día) (Planeta *et al.*, 2002), nosotros no observamos efectos de la administración

de cocaína durante la adolescencia sobre la ganancia de peso corporal. Sorprendentemente, encontramos que tras el cese del tratamiento con cocaína se produjo una disminución de la ganancia de peso corporal entre las hembras no separadas de la madre mientras que se observó lo contrario entre las hembras SM (un sutil aumento de la ganancia de peso corporal), lo cual pone de manifiesto que la SM produce alteraciones de la homeostasis energética (Viveros *et al.*, 2009, 2010b).

2. EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA EXPOSICIÓN EN EDAD ADOLESCENTE A THC Y/O MDMA

El cannabis y el éxtasis se encuentran entre las sustancias ilícitas con mayor índice de consumo entre los adolescentes, sin embargo, son poco conocidos los efectos psiconeuroendocrinos que su consumo combinado puede producir a largo plazo. En un artículo reciente se han descrito varios efectos conductuales de estas drogas en ratas macho (Shen *et al.*, 2011). Pero el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral es el primer estudio que analiza directamente dimorfismos sexuales y que incluye una imagen multidisciplinar, investigando efectos moleculares (determinaciones por *Western blot*), análisis conductuales, que incluyen diversos aspectos del comportamiento tales como la actividad, la ansiedad, la memoria y la capacidad de atención, y efectos metabólicos y endocrinos. Además, como importante complemento de este análisis, hicimos un estudio inmunohistoquímico en el cerebro de los animales, al que nos referiremos al final de este apartado de la Discusión. En vista de los numerosos parámetros que evaluamos en este estudio, los iremos discutiendo bajo diferentes subapartados.

2.1. Peso corporal y temperatura

La administración de THC durante la adolescencia produjo una disminución del crecimiento en las ratas de ambos sexos, apareciendo este efecto antes en las hembras que en los machos. Recordemos que, en línea con anteriores trabajos de nuestro grupo (Mateos *et al.*, 2011; Biscaia *et al.*, 2003) también encontramos en el primer trabajo de esta Tesis Doctoral un efecto similar del agonista CP sobre el peso. Este efecto de los agonistas cannabinoides ha sido también descrito por otros autores (Rubino *et al.*, 2008; Lopez-Moreno *et al.*, 2004). Por lo tanto, nos remitimos a la discusión que de este efecto de la droga hemos hecho en la primera parte de la Discusión.

Los animales de ambos sexos a los que se les administró con MDMA exhibieron una menor tasa de ganancia de peso corporal durante el tratamiento. En un estudio reciente, ratas adolescentes de ambos sexos fueron tratadas una vez al día con 10 mg/kg de MDMA por un total de 10 días consecutivos y, similarmente a nuestros resultados, los autores encontraron una menor tasa de crecimiento en las ratas expuestas a la droga

(Kolyaduke y Hughes, 2013). Se ha visto que un tratamiento durante la adolescencia con MDMA produce un alteración del crecimiento tanto en ratas (Piper *et al.*, 2005; Piper y Meyer, 2004) como en ratones (Achat-Mendes *et al.*, 2003). Este efecto de la MDMA se cree que puede ser debido a la disminución de la ingesta de alimentos debida al efecto anoréxico que provoca esta droga y a la pérdida de agua por evaporación producida por el incremento de la tasa de respiración (Meyer *et al.*, 2008). Nuestros datos también indican que los animales que fueron expuestos tanto a THC como a MDMA fueron los más afectados, mostrando la menor tasa de ganancia de peso corporal a lo largo del periodo de administración. En el estudio de Shen *et al.* (2011) citado al principio de esta parte de la discusión (el único otro estudio en el que hasta ahora se han analizado los efectos de un tratamiento combinado de THC y MDMA durante la adolescencia), los autores encontraron que la administración de MDMA, la administración de THC y la administración de ambas drogas producían una reducción del peso cuando se comparaban con el grupo control. En nuestro caso, la combinación de ambas drogas parece producir efectos aditivos. Hemos de tener en cuenta que Shen *et al.* (2011) utilizaron un protocolo experimental que, en varios aspectos difiere del nuestro. Usaron ratas *Sprague Dawley* macho, la MDMA (2 x 10 mg/kg x 4 h) se administró cada quinto día desde el DP 35 hasta el 60, mientras que el THC (5 mg/kg) se suministró una vez al día. Además, nuestros datos también muestran la existencia de diferencias sexuales. Así, tras el final de los tratamientos, todavía se observaron efectos significativos a largo plazo de ambas drogas, siendo este efecto más duradero en los machos.

Como era de esperar, el primer día de tratamiento con MDMA, este fármaco provocó una hipertermia en los animales adolescentes de ambos sexos. Estudios previos han demostrado que la administración de MDMA provoca una respuesta hipertérmica aguda tanto en ratas adultas (Gurtman *et al.*, 2002; Morley *et al.*, 2001; Malberg y Seiden, 1998) como en adolescentes (Shen *et al.*, 2011; Piper y Meyer, 2006). No se encontró ningún efecto del tratamiento con THC *per se* sobre la temperatura corporal. La reducción de la temperatura corporal ha sido siempre considerada como uno de los efectos típicos del tratamiento con THC en roedores que forma parte de la denominada tétrada de signos inducida por esta sustancia. Sin embargo, un análisis detallado de estudios recientes sugiere que los efectos de los agonistas cannabinoides sobre la temperatura corporal son muy variables y pueden depender, entre otros factores, de la

dosis empleada y de la temperatura ambiente (Taffe, 2012; Shen *et al.*, 2011). A pesar de la falta de efecto del THC, los presentes resultados también muestran que, el primer día de inyección de MDMA, el THC pareció contrarrestar la hipertermia producida por la MDMA en las hembras. Morley *et al.* (2004) también observaron que la administración tanto de THC como del agonista del receptor cannabinoide CP previno la hipertermia inducida por MDMA. Es más, Shen *et al.* (2011) que sí describieron un efecto hipertérmico del THC, también encontraron una reducción del efecto hipertérmico de la MDMA como resultado de la exposición anterior al cannabinoide. Nuestros resultados también indican que mientras que el efecto hipertérmico de la MDMA no se vio atenuado con el paso de los días, i.e. los animales no mostraron una tolerancia a este efecto, el THC tendió a contrarrestar el efecto hipertérmico de la MDMA tan solo después del primer día de inyección. Así pues, los efectos “protectores” del THC sobre la hipertermia inducida por MDMA observada en ciertos estudios con tratamientos agudos en ratas (Morley *et al.*, 2004) y ratones (Tourino *et al.*, 2010), podrían no ser una correcta representación de las consecuencias de los actuales hábitos de consumo en los seres humanos ya que los tratamientos crónicos constituyen un modelo más preciso que los agudos. Es más, podrían existir diferencias interespecíficas dado que se ha visto en otros trabajos que en humanos la inhalación de THC no produce ninguna disminución del aumento de temperatura producido por MDMA, e incluso puede llegar a potenciarlo (Dumont *et al.*, 2009).

2.2. Efectos sobre la conducta

Ninguno de los fármacos empleados modificó la actividad general (deambulación total) en el TCA. Sin embargo, el THC produjo una disminución del porcentaje de distancia recorrida en el interior del aparato, mientras que el comportamiento exploratorio medido como la investigación de los agujeros se vio marcadamente afectado por el tratamiento con MDMA. De hecho, se vieron significativamente disminuidas tanto la frecuencia como el tiempo que los animales pasaron explorando los agujeros. Estos resultados concuerdan con los de Shen *et al.* (2011) quienes también encontraron que en el TCA el grupo administrado con MDMA mostró una disminución significativa de la exploración de los agujeros cuando se compararon con los animales control, además, también encontraron que el tratamiento con MDMA disminuía la exploración de agujeros nuevos, i.e. los animales tendían a

explorar siempre los mismos agujeros. Estos datos sugieren que ambas drogas producen un aumento de la emotividad o de la ansiedad a largo plazo. En aparente contradicción con estos resultados, la administración de MDMA aumentó el tiempo de exploración de los brazos abiertos en el LCE. El aumento de este parámetro ha sido clásicamente relacionado con un efecto de tipo ansiolítico (Pelow y File, 1986). Sin embargo, como ya hemos previamente explicado, también puede interpretarse como un aumento de la conducta de toma de riesgos (Davis *et al.*, 2009; Löfgren *et al.*, 2006). A nuestro parecer este fue el caso en los animales tratados con MDMA, cuyo comportamiento podría reflejar un aumento de la impulsividad. Este punto de vista está apoyado también por el hecho de que los animales tratados con MDMA mostraron igualmente un aumento significativo del número de caídas del LCE con respecto a los animales tratados con salino. Una observación similar encontramos en Shen *et al.* (2011) quienes encontraron en el test de emergencia realizado bajo una luz fluorescente (que maximizaría la ansiedad asociada a abandonar la zona segura del aparato) que la exposición adolescente a la MDMA provocó una reducción significativa de la latencia a la primera salida. De hecho, Meyer *et al.* (2008) han descrito que la exposición intermitente durante la adolescencia a MDMA provoca un aumento de la impulsividad en el LCE. Este punto de vista también se vería avalado por los resultados obtenidos en diversos estudios con consumidores de éxtasis (Karlsten *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2002; Morgan, 2000). Al igual que en el TCA, la administración de THC durante la adolescencia provocó a más largo plazo una disminución del tiempo que los animales pasaron explorando las zonas internas del aparato en el campo abierto, lo cual vuelve a revelar un aumento de la emotividad/ansiedad, y la MDMA, *per se*, produjo un efecto similar. En un reciente estudio en ratas se ha visto que el tratamiento con MDMA durante la adolescencia puede producir un incremento de la ansiedad en etapas adultas (Kolyaduke y Hughes, 2012) y estudios previos revelan que el uso habitual de esta droga por adolescentes puede llegar a asociarse con un aumento de la ansiedad (Lieb *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en estas pruebas conductuales también han revelado la existencia de un gran número de diferencias sexuales esperables. Así, en el LCE, las ratas hembra exploraron durante más tiempo los brazos abiertos del aparato que las ratas machos; en el campo abierto las hembras exhibieron unos mayores niveles de actividad locomotora (tanto horizontal como vertical) que los machos. Estos dimorfismos sexuales han sido ampliamente descritos en la literatura [ver por ejemplo Mateos *et al.*

(2011), Johnston y File (1991) y Gray (1971)] y también en otros experimentos de esta Tesis Doctoral.

En el test de reconocimiento de objetos (NOT, del inglés *Novel object test*), que ofrece información sobre la memoria de reconocimiento, la administración de THC produjo una alteración del índice de discriminación en los animales hembra. Como expusimos en la Introducción de esta Memoria, el periodo peripuberal parece ser crítico para el desarrollo de los receptores cannabinoides CB1 y de los niveles de endocannabinoides (Viveros *et al.*, 2011, 2012a; Wenger *et al.*, 2002; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 1993). Por tanto, es lógico pensar que una interferencia crónica en el normal desarrollo del SEC mediante el uso de cannabinoides durante este intervalo crítico de tiempo pueda producir una alteración funcional severa y persistente. Efectivamente, este efecto ha sido observado tanto en animales de experimentación como en seres humanos (Meier *et al.*, 2012; Fernández-Espejo *et al.*, 2009; Schneider y Koch, 2007). Existen de hecho evidencias de que una administración crónica con diversos agonistas sintéticos cannabinoides durante el periodo periadolescente produce una alteración persistente de la memoria en ratas adultas (Mateos *et al.*, 2011; O'Shea *et al.*, 2006; Schneider y Koch, 2003). Por ejemplo, Rubino *et al.* (2009) encontraron que las ratas macho, tratadas desde el DP 35 al 45 con una dosis creciente de THC dos veces al día (2.5 mg/kg DP 35-37; 5 mg/kg DP 38-41; 10 mg/kg DP 42-45), no mostraron ninguna alteración en la memoria aversiva (mediante la prueba de la evitación pasiva) pero sí una peor actuación que los animales tratados con vehículo en el laberinto radial, lo que sugiere un déficit en la memoria de trabajo espacial. En contraste, Cha *et al.* (2006, 2007) no encontraron, en ratas previamente expuestas a THC, efectos significativos a largo plazo producidos por este cannabinoide en el aprendizaje espacial ni tampoco en el no espacial. Estas diferencias en cuanto a los resultados son atribuibles, al menos en parte, a que las dosis de THC empleadas por Cha y colaboradores en sus estudios son menores. En el presente trabajo hemos observado que el efecto perjudicial del THC fue sólo significativo en los animales hembra, lo que sugiere una mayor vulnerabilidad de este sexo al THC, al menos en lo que se refiere a ciertos aspectos de tipo emocional y cognitivo. Apoyando este punto de vista, Rubino *et al.* (2008) demostraron que la administración crónica de THC a ratas adolescentes produjo un comportamiento depresivo en la edad adulta, viéndose tal efecto en las ratas hembra, pero no en los machos. La mayor parte de las investigaciones realizadas en

seres humanos sugieren que las mujeres son más sensibles a los efectos deletéreos de los cannabinoides que los hombres, y esta misma diferencia también se ha descrito en estudios con roedores [ver para revisión Craft *et al.* (2013)]. Las diferencias sexuales en los efectos de los agonistas cannabinoides podrían atribuirse, al menos parcialmente, a las diferencias de base que existen en la densidad y actividad de los receptores CB1 cerebrales. Así, recientemente, hemos descrito una diferencia en la actividad de los receptores CB1 entre animales control (inyectados con vehículo) macho y hembra, observándose una mayor funcionalidad/actividad de estos receptores en las hembras comparadas con los machos. Por otro lado, las hembras tendieron a mostrar una menor densidad de receptores CB1 (efecto general del sexo en la formación hipocampal) (Mateos *et al.*, 2011), y en anteriores secciones de la Discusión de esta Tesis (apartados 1.1. y 1.3.) hemos discutido resultados similares en otras regiones cerebrales de los animales controles. Sería lógico pensar que la menor densidad del receptor CB1 encontrado en las hembras pudiera de alguna manera compensarse por una mayor actividad funcional, al menos en ciertas regiones cerebrales. Las diferencias sexuales en la respuesta a los cannabinoides pueden deberse a efectos activacionales y organizacionales de las hormonas gonadales, las cuales provocan una diferenciación sexual del cerebro durante los periodos críticos del desarrollo, i.e. los periodos perinatal y periadolescente, siendo el estradiol la hormona que más contribuye a tales diferencias en los efectos de los cannabinoides en los animales adultos. Muchas, aunque no todas las diferencias sexuales en los efectos de los cannabinoides exógenos pueden atribuirse a las diferencias sexuales que hay en el SEC de los roedores, aunque esto mismo no ha podido todavía establecerse firmemente para los seres humanos [ver para revisión Craft *et al.* (2012) y Viveros *et al.* (2012b)]. Los factores farmacocinéticos también podrían desempeñar un papel importante en las diferencias sexuales de los efectos de los cannabinoides. Las enzimas citocromo P450 hepáticas, responsables del metabolismo oxidativo de los cannabinoides, parecen ser específicas del sexo en las ratas, así, en las ratas hembra el THC se metaboliza formando preferentemente un metabolito altamente activo, mientras que en los machos se metaboliza formando diversos compuestos. Estas diferencias en el metabolismo podrían contribuir, por ejemplo, a un efecto más pronunciado y duradero del THC sobre la nocicepción y el comportamiento locomotor en las ratas hembra. Para los seres humanos, dado que el THC se almacena en el tejido adiposo, que tiende a tener una mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres

(27% de grasa en mujeres frente al 15% de los hombres), la distribución y excreción de este agonista cannabinoide podría ser diferente entre los dos sexos, haciendo que las mujeres, al tener un mayor índice de grasa corporal, almacenaran una mayor cantidad de THC que los hombres [ver para revisión Anderson *et al.* (2010)].

Como ya se ha explicado a lo largo de esta Tesis Doctoral, el periodo adolescente parece poseer una vulnerabilidad única a al menos algunos de los efectos adversos de los cannabinoides. Por ejemplo, Schneider *et al.* (2008) observaron que la administración crónica de WIN55,212-2 durante la pubertad, pero no durante la etapa adulta, producía alteraciones persistentes de la memoria social y de trabajo, esta última medida en el NOT, así como a un aislamiento social y a alteraciones del comportamiento social y del autoaseo o *grooming*. Es más, la administración aguda de este agonista cannabinoide sintético producía efectos más severos sobre el comportamiento de animales púberes que en el de animales adultos. En línea con estos datos, aquellos consumidores de cannabis que empezaron a consumirlo antes de los 17 años exhibían una ejecución cognitiva más pobre que aquéllos que empezaron a consumirla después de dicha edad o que los sujetos control, especialmente en cuanto al coeficiente intelectual verbal (Pope *et al.*, 2003). Es posible que los efectos a largo plazo sobre la función cognitiva de la exposición adolescente al cannabis estén relacionados, al menos en parte, con una función sináptica deficiente en el hipocampo (Rubino *et al.*, 2009). En cualquier caso, merece la pena mencionar que, bajo ciertas condiciones experimentales, la administración de cannabinoides produjo una alteración de la cognición independientemente de la edad de tratamiento. Así, O'Shea *et al.* (2006) encontraron que la exposición crónica al agonista cannabinoide CP durante la etapa perinatal, la adolescencia o la vida adulta causó alteraciones similares a largo plazo de la memoria en ratas. Bajo las presentes condiciones experimentales no se observó ningún efecto de la MDMA sobre el índice de discriminación del NOT. Este resultado concuerda con los de Kolyaduke y Hughes (2013), quienes no encontraron ningún efecto del tratamiento con MDMA durante la adolescencia (10 días de tratamiento de DP 35 a 45) sobre la memoria espacial (laberinto en Y) o de trabajo (NOT). Sin embargo, los efectos de la MDMA podrían observarse en otras prueba cognitivas y/o a corto plazo, dado que estudios tanto en animales como en seres humanos revelan que la MDMA es deletérea para la función cognitiva. Por ejemplo, estudios previos han desvelado que la administración de MDMA puede alterar la memoria de trabajo en ratas

(Rodsiri *et al.*, 2011; Piper y Meyer, 2004) y en seres humanos (Bolla *et al.*, 1998; Parrott *et al.*, 1998) así como el aprendizaje asociativo (Montgomery *et al.*, 2005) en consumidores y abstinentes. Merece la pena mencionar que un gran número de estudios animales sugieren que puede existir un periodo crítico para los efectos a largo plazo de la MDMA sobre la cognición. Por ejemplo, el tratamiento con MDMA desde el DP 11 al 20 produjo una alteración del aprendizaje espacial, causó hipoactividad y alteró la memoria de reconocimiento de objetos, cuando se testó a los animales en la etapa adulta. Estos efectos sobre el aprendizaje aparecen poco después de la exposición a la MDMA y se ha visto que duran al menos un año (es decir, la mitad de la vida del individuo), sin embargo, la administración de MDMA en edades más tempranas no causó ningún efecto sobre la conducta cognitiva. Estos resultados demuestran la existencia de un periodo crítico para los efectos cognitivos de la MDMA durante el segundo intervalo de 10 días de vida del animal (ver para revisión Skelton *et al.* (2008)]. Los presentes resultados también muestran que la exploración de objetos durante las sesiones de la prueba se vio significativamente afectada por el tratamiento con MDMA con una disminución del tiempo que pasaron explorando ambos objetos, lo cual podría sugerir una menor capacidad de atención, una hipótesis que parece factible por los efectos observados en la PPI por el tratamiento con MDMA.

La PPI, un test que hemos utilizado en dos de los experimentos que componen la Tesis Doctoral, consiste en la supresión del reflejo de sobresalto que ocurre cuando el estímulo principal es precedido por uno de menor intensidad (Graham, 1975). Esta medida de filtrado de entrada de información sensomotora se cree que está controlada por estructuras localizadas en la parte inferior del tronco encefálico y mediada por aferentes provenientes del prosencéfalo (Weiss y Feldon, 2001). En algunas alteraciones neuropsiquiátricas, se ha observado una deficiencia de la PPI [ver para revisión Li *et al.* (2009)]. Por ejemplo, se han relacionado alteraciones de la PPI con el déficit de filtrado de la entrada de información sensomotora y de la capacidad de atención presentes en la esquizofrenia (Van den Buuse *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2001; Weiss y Feldon, 2001). Los fármacos que actúan como liberadores de serotonina, como por ejemplo la MDMA, producen una alteración en el filtrado de entrada de información sensomotora, la cual puede medirse con la PPI. Por ejemplo, en estudios previos realizados en ratas adultas se ha visto que la administración aguda de MDMA puede producir una alteración de este fenómeno (Vollenweider *et al.*, 1999) de una manera dosis-dependiente y en ambos

sexos (Bubeníková *et al.*, 2005). En un estudio reciente, sin embargo, no se observó ningún efecto de la droga tras un tratamiento crónico intermitente (Shortall *et al.*, 2012). Los presentes resultados muestran cómo la administración adolescente de MDMA produjo una disminución significativa del porcentaje de PPI en los animales adultos, siendo la magnitud de este efecto dependiente de la intensidad del prepulso. Las discrepancias con el estudio de Shortall *et al.* (2012) podrían sugerir que los animales adolescentes son particularmente vulnerables a los efectos de la MDMA sobre la PPI. Sin embargo, no podemos excluir las diferentes condiciones experimentales entre ambos trabajos. Por ejemplo, Shortall *et al.* (2012) emplearon animales con un amplio rango de pesos corporales (170-305 g) y, por tanto, de edad. De hecho describen a los animales como “jóvenes adultos” y el protocolo de administración era una dosis de MDMA de 10 mg/kg dos días consecutivos cada semana durante tres semanas. Los presentes resultados no revelaron ningún efecto significativo del THC *per se* sobre la PPI. Esto contrasta con los numerosos datos que muestran una alteración de la PPI producida por el tratamiento crónico durante la adolescencia con agonistas cannabinoides [ver por ejemplo: Wegener y Koch (2009), Schneider *et al.* (2005) y Schneider y Koch (2003)], incluidos nuestros resultados ya discutidos en un apartado anterior referido a los efectos de la exposición adolescente al CP. La aparente discrepancia podría deberse a que las dosis de THC empleadas en este estudio no fueron suficientemente altas como para producir una alteración de la PPI. Sin embargo, es importante tener en cuenta que tras el estímulo intermedio de 75 dB la MDMA sólo pudo producir una disminución de la PPI en combinación con la administración de THC. Este resultado indica que el THC, incluso a dosis sub-efectivas, podría potenciar los efectos de la MDMA y que la combinación de ambas drogas podría incrementar la posibilidad de desarrollar un cuadro de tipo psiquiátrico; este resultado tiene pues importantes consecuencias en relación al consumo humano. Cabe destacar que, además de alterar la PPI, la administración de MDMA durante la adolescencia puede haber causado un aumento de la impulsividad como ya ha sido mencionado anteriormente. La alteración de la PPI se observa en pacientes con patologías neuropsiquiátricas incluyendo aquéllos que sufren de una sintomatología psicótica, y una personalidad de búsqueda de la novedad y de toma de riesgos podría incrementar las posibilidades de autoadministrarse diversas drogas de abuso (Sher *et al.*, 2000; Wills *et al.*, 1994). Por lo que es posible que el consumo de MDMA durante la adolescencia aumente la

vulnerabilidad a desarrollar ciertos desórdenes psiquiátricos tales como psicosis y que su uso facilite el consumo de otras drogas. Encontramos también diferencias sexuales en el test de la PPI entre los animales control. De hecho, se observaron diferencias sexuales en cada una de las intensidades prepulso testadas, observándose un menor filtrado de la entrada de información sensoriomotora en las hembras que en los machos. Diversos estudios han encontrado diferencias sexuales en la PPI de personas sanas (Kumari *et al.*, 2004) así como de ratas (Marriot *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 1999), siendo los machos los que poseen una mayor PPI.

2.3. Cambios neuroquímicos

Se evaluaron diversos efectos neuroquímicos del THC y de la MDMA para identificar posibles mecanismos neurobiológicos relacionados con los cambios conductuales producidos por ambos tratamientos crónicos. Se investigó primero la inmunorreactividad de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc, del inglés *Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein*) la cual es rápidamente modulada dependiendo de la actividad sináptica (Korb y Finkbeiner, 2011; Bramham *et al.*, 2008). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Arc en el córtex prefrontal de los machos, sin embargo, en el de las hembras pudo observarse una disminución de la inmunorreactividad para Arc en los animales tratados con THC. En el hipocampo, la administración adolescente de THC redujo la expresión de Arc en ambos sexos. Además, se encontró una interacción entre ambas drogas en esta estructura cerebral dado que la MDMA sólo produjo una disminución de la inmunorreactividad para Arc en las hembras tratadas con THC pero no en los animales tratados con vehículo. Es interesante señalar que la regulación a la baja de la proteína Arc en el hipocampo utilizando oligodesoxinucleótidos antisentido perjudica la consolidación del aprendizaje espacial (Guzowski *et al.*, 2000), lo que apunta a una relación entre los déficits de memoria encontrados en las hembras tratadas con THC-MDMA con una disminución de la expresión de Arc.

También investigamos la inmunorreactividad a las fosfo-quinasas reguladas por señal extracelular (pERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinases*), ya que, como han descrito otros autores, puede verse modulada por el tratamiento con THC (Rubino *et al.*, 2004) y con MDMA (Di Benedetto *et al.*, 2011). Los cambios en la fosforilación de la pERK están asociados a alteraciones del estado emocional en

modelos animales (Einat *et al.*, 2003). En nuestro modelo experimental la señalización de pERK se vio regulada a la baja en el córtex frontal de las ratas macho expuestas a MDMA mientras que no se encontraron diferencias significativas en las hembras. En los machos tratados con MDMA, los cambios en la inmunorreactividad de la pERK podrían relacionarse con las alteraciones conductuales halladas en el TCA, i.e. una disminución de la frecuencia y el tiempo de investigación de los agujeros, indicativo de una elevada emotividad, y en el LCE donde se vio un aumento del comportamiento de riesgo. Por otro lado, las hembras tratadas con MDMA mostraron unas alteraciones del comportamiento a corto plazo similares a las de los machos en el TCA y en el LCE aunque no encontramos las mismas alteraciones en los niveles de pERK durante la edad adulta. Se sabe que el estradiol ejerce algunos de sus efectos neuroprotectores a través de la activación de la vía de las pERK (Lebesgue *et al.*, 2009). Podríamos especular entonces con la idea de que en las hembras las hormonas gonadales mediaron la restauración de este sistema de señalización. En nuestro diseño no observamos ningún efecto del THC sobre la vía de señalización de las pERK. Rubino *et al.* (2004) observaron que inmediatamente después de un tratamiento agudo, y también de uno crónico, con THC se producía un aumento de la inmunorreactividad de la pERK en diversas áreas cerebrales, sin embargo, en nuestro protocolo, el tratamiento con THC finalizó mucho antes de los análisis bioquímicos. Por tanto, es posible que la vía de señalización de las pERK hubiese sido completamente restaurada tras el paso de todo ese tiempo.

Por último, el THC produjo una disminución de la expresión de ARNm para la prepro-orexina en el hipotálamo de ratas macho, aunque el tratamiento combinado con MDMA contrarrestó este efecto. En un estudio de Rao *et al.* (2013) se describe cómo la administración repetida de otro psicoestimulante, la cocaína, en ratones produce alteraciones a largo plazo de la potenciación de las sinapsis glutamatérgicas en neuronas productoras de orexina. Es posible que un mecanismo excitatorio similar del tratamiento intermitente con MDMA sea el responsable del bloqueo producido sobre los efectos del THC en la expresión de orexina. No se encontró ningún efecto sobre los niveles de ARNm para prepro-orexina de ninguno de los tratamientos en hembras, lo cual sugiere de nuevo la existencia de un mecanismo neuroprotector de las neuronas productoras de orexina hipotalámicas contra las alteraciones relacionadas con el THC en este sexo, probablemente relacionado con los esteroides sexuales.

2.4. Niveles hormonales

De acuerdo con estudios previos de nuestro grupo en los que empleamos el agonista cannabinoide CP, incluyendo el ya expuesto en el primer apartado de la Discusión (Biscaia *et al.*, 2003), la administración crónica con THC durante la adolescencia no produjo ningún efecto en los niveles basales de corticosterona en ninguno de los sexos. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo acerca de efectos a largo plazo de SM y CP sugieren que los efectos de los agonistas cannabinoides sobre la función del eje HHA podrían aparecer ante la exposición a agentes estresantes (efectos detectados al medir los niveles de corticosterona y ACTH tras exposición a la prueba de PPI. Los presentes resultados indican que la exposición intermitente a la MDMA durante la adolescencia produjo una disminución significativa a largo plazo de los niveles de corticosterona en los machos. Los efectos neuroendocrinos de la MDMA han sido principalmente estudiados tras tratamientos agudos y como una respuesta a corto plazo, mientras que se conoce muy poco sobre los efectos a largo plazo tras un tratamiento crónico, particularmente durante el periodo periadolescente. Ha sido descrito con anterioridad que la corticosterona se encuentra aumentada 30 minutos después de un tratamiento con MDMA y vuelve a los niveles control a las 6 horas; un efecto que además es dependiente de la dosis (Nash *et al.*, 1988). En otro diseño experimental en el que los animales recibían 3 dosis de MDMA (con dos horas de intervalo entre cada dosis) y se analizaban los niveles de corticosterona dos semanas después en respuesta a una estimulación con MDMA se observó que estos animales presentaban una menor elevación de los niveles de corticosterona que aquellos animales que fueron pretratados con salino (Baumann *et al.*, 2007). Para encontrar un modelo más parecido al empleado en el presente estudio debemos recurrir de nuevo al trabajo de Shen *et al.* (2011). En este experimento se midieron los efectos a largo plazo de la exposición durante la adolescencia a THC y MDMA en los niveles basales de corticosterona y en respuesta a la exposición al campo abierto, y no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona (basales o en respuesta a un estrés de nivel moderado) debidas a los tratamientos farmacológicos. Recordemos que su protocolo de administración de las drogas difería del nuestro en varios aspectos y, además, en su caso las muestras de plasma para estudiar los niveles de corticosterona basales se recogían a DP 66, y las muestras para medir la corticosterona en respuesta a un estrés de nivel moderado a DP 68. Gerra *et al.* (2003) describieron en consumidores frecuentes de

éxtasis una elevación de los niveles basales de cortisol y ACTH y una respuesta mayor ante un agente estresante psicosocial cuando fueron comparados con los sujetos control. Esta discrepancia puede ser resultado de diferencias entre ambas especies (ratas *vs* seres humanos) en la reactividad neuroendocrina a la MDMA o también a las diferencias en la cantidad y/o patrón de consumo de la MDMA en los seres humanos, o en el tiempo que pasa entre la exposición a la droga y la medida endocrina. En cualquier caso, los presentes resultados de nuevo enfatizan la modulación que el factor sexo ejerce sobre los efectos de las drogas de abuso. Como en la mayoría de los parámetros estudiados en el presente trabajo, el análisis de los niveles de corticosterona también en este experimento presentaron un marcado dimorfismo sexual entre los animales control, con unos niveles circulantes de esta hormona mayores en hembras que en machos a las dos edades analizadas i.e. DP 50 y edad adulta (alrededor del DP 90). Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que tales diferencias sexuales aparecían en la edad adulta (Viveros *et al.*, 1988), la adolescencia (Llorente *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2002) y en animales neonatales (Borcel *et al.*, 2004), lo cual indica que este tipo de diferencia sexual aparece mucho antes de la pubertad.

Se analizaron igualmente los niveles circulantes de leptina a dos edades, durante la edad adulta (alrededor del DP 90) y a DP 50. Los tratamientos durante la adolescencia con THC y MDMA no produjeron ningún efecto sobre los niveles de esta hormona en la etapa adulta. Sin embargo, a DP 50, las hembras tratadas crónicamente con THC durante la adolescencia mostraron una disminución de los niveles de leptina. Recordemos que en el primer experimento de esta Tesis Doctoral encontramos que un tratamiento crónico adolescente con el agonista cannabinoide CP (0,4 mg/kg) provocó una reducción de los niveles de leptina entre 30 y 33 días después del final del tratamiento. Podemos concluir que la exposición a un cannabinoide durante el periodo periadolescente puede actuar a largo plazo reduciendo los niveles de leptina, aunque la extensión de tal efecto puede depender, entre otros factores, del agonista cannabinoide utilizado, la dosis y el esquema de administración. Los presentes resultados no mostraron efectos a largo plazo de la administración de MDMA durante la adolescencia sobre los niveles de leptina medidos a DP 50 y 90. A pesar de los efectos anoréxicos que presenta esta droga y sus efectos sobre el peso corporal, existe poca información que asocie los efectos de la MDMA con las hormonas involucradas en la regulación del apetito. Los resultados obtenidos por Kobeissy *et al.* (2008) en ratas macho de 60 días

de edad demuestran que una simple dosis de 5 mg/kg de MDMA no produce ningún efecto observable sobre los niveles de leptina en ninguno de los intervalos de tiempo estudiados, mientras que una dosis de 20 mg/kg produce cambios significativos cuando se compara con el grupo control 6 horas después del tratamiento, y la dosis de 40 mg/kg produce cambios significativos incluso 12 horas después de la administración del psicoestimulante. 24 y 48 horas después, los niveles de leptina tras las dosis de 20 y 40 mg/kg de MDMA comienzan a normalizarse hasta alcanzar valores control. Esto sugiere que la MDMA ejerce un efecto dependiente de la dosis y transitorio, y éste puede haber sido el caso en nuestro experimento, en el que no pudimos detectar ningún efecto sobre la leptina tras un periodo de aclaramiento de la droga mucho más largo. Una vez más, encontramos diferencias sexuales entre los animales control en la edad adulta, con los machos exhibiendo mayores niveles de leptina que las hembras. Sin embargo, esta diferencia sexual no pudo encontrarse en los animales a DP 50. Los presentes resultados confirman la ya bien conocida diferencia en los niveles de leptina entre machos y hembras adultos y concuerdan con trabajos previos en los que se observaron mayores niveles de leptina en machos en relación a las hembras, efecto que se vuelve evidente sólo tras la pubertad (Mela *et al.*, 2012a; Viveros *et al.*, 2010b; Llorente *et al.*, 2011; Smith y Waddell, 2003).

2.5. Análisis inmunohistoquímico

En este trabajo proporcionamos la primera evidencia sobre las consecuencias, tanto en machos como en hembras, de la administración de THC y/o MDMA durante la adolescencia sobre células de glía (relacionadas con neuroinflamación) y sobre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide de animales adultos.

La MDMA presenta propiedades neurotóxicas y neuroinflamatorias que son más evidentes en la microglía que en la astrogía (Frau *et al.*, 2013). De acuerdo con esta observación, nuestros resultados demuestran que la MDMA no produce efectos significativos sobre la inmunorreactividad a GFAP en el hipocampo mientras que produce unos efectos muy evidentes sobre la reactividad microglial. El estudio anteriormente mencionado, donde los efectos de la MDMA sobre la reactividad de la glía fueron analizados en el núcleo accumbens, el estriado, la sustancia negra y el córtex, muestra que la MDMA ejerció sus efectos de manera más contundente en el estriado (Frau *et al.*, 2013). Sin embargo, los efectos sobre el hipocampo todavía no han

sido estudiados en profundidad. Los presentes resultados muestran que, en esta región cerebral, el THC produjo un aumento significativo del porcentaje de área inmunorreactiva para el GFAP en ambos sexos. A pesar de que se observó una tendencia en la misma dirección debida al tratamiento con MDMA, no se observaron efectos aditivos de ambas drogas cuando se administraron conjuntamente, sino que, en hembras, encontramos que la MDMA contrarrestó los efectos del THC, apoyando así otros estudios que han descrito una interacción funcional entre el THC y la MDMA en el control de la activación astrocítica (Tourinho *et al.*, 2010). Los presentes resultados también muestran que en los machos ambas drogas, bien por separado o en combinación, causaron un aumento significativo del porcentaje de células microgliales reactivas (inmunorreactivas para el anticuerpo anti-molécula mediadora de la unión de calcio ionizado tipo 1 específica de macrófagos y microglía ó Iba-1). En estudios previos se ha observado que un tratamiento crónico con MDMA en ratas *Dark Agouti* macho produjo un aumento de los niveles de interleukina-1 β (IL-1 β) (Orio *et al.*, 2004), que es una mediadora clave de las respuestas microgliales tanto en estados fisiológicos como en estados patológicos (Griffin *et al.*, 1998; Sheng *et al.*, 1996; Giulian *et al.*, 1988). Con respecto al THC, estudios *in vitro* con células de ratón han mostrado que este compuesto modula la bioactividad de la IL-1 β (Shivers *et al.*, 1994), controlando así la activación de la microglía. Los resultados obtenidos en las hembras con respecto a los efectos de las drogas sobre la reactividad de la microglía fueron exactamente opuestos a los de los machos. Así, en hembras, cada droga administrada por separado, produjo una disminución significativa del porcentaje de células microgliales reactivas, mientras que la combinación de ambos tratamientos causó una “normalización” de este parámetro hasta alcanzar niveles de hembras controles. Es importante señalar que el estado basal de reactividad de la microglía fue completamente distinto entre machos y hembras control; las hembras presentaron unos niveles mayores del fenotipo reactivo que los machos. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se observó que los machos presentan un mayor número de células microgliales durante el desarrollo postnatal temprano (DP 4), mientras que las ratas hembra expresan un mayor número de microglía reactiva durante la adolescencia y la etapa adulta (DP 30-60). Esta diferencia sexual es extensible a los niveles de quimioquinas y la actividad de las células microgliales, lo que podría explicar diferencias en el rol y contribución de su respuesta ante diversos agentes adversos (Schwartz *et al.*, 2012). En vista de los

presentes resultados, es probable que dependiendo del estado activacional inicial de la microglía (que es claramente distinto entre machos y hembras), el THC y la MDMA produzcan efectos muy diferentes que pueden incluso llegar a ser opuestos. Se ha observado, en estudios previos, que el agonista cannabinoide sintético WIN55,212-2 administrado durante 21 días a ratas *Sprague-Dawley* macho causó una disminución del número de células microgliales activas cuando se administró conjuntamente con la molécula proinflamatoria LPS; sin embargo, no causó ninguna disminución de la reactividad microglial cuando el LPS no estuvo presente (Marchalant *et al.*, 2007). Esta observación indica que los agonistas cannabinoides pueden presentar un efecto antiinflamatorio cuando existe un estado activado previo de la microglía. Es más, Marchalant *et al.* (2007) también hallaron que el efecto antiinflamatorio se producía en el giro dentado y el CA1 de la formación hipocampal pero no en el CA3 o el córtex entorrinal, lo que señala la existencia de un efecto dependiente del área. El hecho de que en el presente estudio el THC *per se* produjese una reducción del porcentaje de células reactivas microgliales en las hembras podría atribuirse al fenotipo de tipo inflamatorio que éstas muestran en condiciones basales cuando se comparan con los machos. En cuanto a los efectos opuestos de la MDMA sobre la reactividad de las células de microglía entre machos y hembras, Connor *et al.* (2005) describieron que la administración aguda de MDMA a ratas *Sprague-Dawley* macho produjo un aumento de los niveles de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 y una disminución del factor de necrosis tumoral alfa (citokina proinflamatoria) cuando se coadministró con LPS tanto *in vivo* como *in vitro*; mientras que otros autores han encontrado que la MDMA ejerce efectos proinflamatorios cuando se inyectan en condiciones basales (Touriño *et al.*, 2010). Estos estudios sugieren que la MDMA también necesita de un estado previo activado de las células microgliales para ejercer efectos de tipo “antiinflamatorio”. En línea con este razonamiento, y similarmente a lo anteriormente descrito para el THC, nuestros resultados demuestran que la MDMA redujo el porcentaje de células microgliales con un fenotipo reactivo sólo en las hembras ya que es el sexo que exhibe un mayor número de células microgliales activas en condiciones basales. El hecho de que tanto el THC como la MDMA, cuando fueron administrados por separado, disminuyeran significativamente la activación de la microglía con respecto al grupo control, lo que podría considerarse como un efecto “antiinflamatorio”, no debería ser visto como un efecto beneficioso dado que la acción de las drogas lo que provoca es un

cambio de los niveles basales de este parámetro. De manera similar, entre las hembras, la combinación de ambas drogas produjo un retorno a los niveles control del porcentaje de células microgliales reactivas. Una posible explicación para esta interacción es que, de acuerdo con nuestro protocolo experimental, los animales tratados con ambas drogas recibieron dos inyecciones de THC antes de comenzar el tratamiento con MDMA, y es posible que cuando empezó el tratamiento con MDMA, el THC ya hubiese causado una disminución de la microglía reactiva de las hembras. Como ya hemos indicado, los resultados de Connor *et al.* (2005) sugieren que la MDMA necesita de un estado activado previo para reducir la activación de la microglía. Es más, nuestros resultados demuestran que con una menor activación microglial, esta droga produce un aumento de la microglía reactiva (en nuestro caso en los machos). Por tanto, podemos especular que bajo el efecto del THC, la adición de MDMA podría producir algún tipo de efecto compensatorio.

Son muchos los estudios que han demostrado que la MDMA produce una pérdida de axones serotoninérgicos y una reducción de los niveles de serotonina (Baumann *et al.*, 2007; Piper, 2007). De acuerdo con esta información, nuestros resultados muestran que la exposición a MDMA durante la adolescencia causó una reducción a largo plazo de las fibras inmunorreactivas para el transportador de serotonina (SERT) en ambos sexos. Los efectos neurotóxicos de la MDMA sobre los axones serotoninérgicos parecen depender del efecto hipertérmico de la droga y de la ruta de administración (Morley *et al.*, 2004). Meyer *et al.* (2008) encontraron una disminución significativa de la inmunorreactividad al SERT en el hipocampo de animales macho adultos tras un protocolo de administración de MDMA muy similar al utilizado en el presente estudio donde encontramos una respuesta hipertérmica al tratamiento con MDMA. Nuestros datos también indican que el THC causó un aumento significativo de las fibras SERT+ en los machos, sin cambios en las hembras. Se sabe que el SEC juega un papel crucial en los procesos de neurodesarrollo durante la adolescencia (Viveros *et al.*, 2012a) y modula la actividad del sistema serotoninérgico mediante la inhibición de la liberación de serotonina a través de la activación de los receptores CB1 (Haj-Dahmane y Shen, 2011). El tratamiento crónico con THC y la resultante reducción de los niveles de serotonina podrían conducir a una reorganización de las fibras serotoninérgicas que podría verse reflejada en un incremento de la expresión del SERT en el córtex parietal. De hecho, datos previos indican que los

cambios en el patrón de expresión postnatal del SERT pueden ser resultado de una reorganización de la innervación serotoninérgica (Hansson *et al.*, 1998). En contraste con nuestros resultados, Shen *et al.* (2011) no encontraron ninguna alteración significativa de la expresión del SERT en el córtex parietal de animales adultos tratados crónicamente con THC (5 mg/kg/día) durante la adolescencia. Esta aparente discrepancia podría atribuirse a los diferentes tratamientos recibidos por los animales en ambos estudios, dado que, en nuestro caso, administramos a los animales una dosis creciente de THC (2,5, 5 y 10 mg/kg), lo que seguramente previno el desarrollo de tolerancia a los efectos del THC. En el presente experimento también encontramos una normalización del número de fibras SERT+ a valores de los animales control en aquellas ratas que fueron expuestas a ambas drogas. Existen varios estudios que sugieren que la administración de THC previene alguno de los efectos neurotóxicos de la MDMA (Tourinho *et al.*, 2007, 2010; Parrott *et al.*, 2007; Morley *et al.*, 2004). Esta idea proviene de la suposición de que el THC y la MDMA producen, cuando se administran de manera aguda, a corto plazo, efectos farmacológicos opuestos sobre ciertos parámetros tales como la locomoción, la respuesta térmica y la ansiedad (Tourinho *et al.*, 2010). Como ya hemos mencionado, la mayoría de los estudios sobre este tema han investigado los efectos agudos y/o a corto plazo del tratamiento combinado con THC y MDMA en animales adultos, mientras que existe muy escasa información sobre efectos a largo plazo (tras un periodo relativamente largo de aclaramiento de la droga) de tratamientos crónicos durante el periodo adolescente, que es cuando con mayor frecuencia suelen ser consumidas estas drogas (EMCDDA, 2012). En estas últimas condiciones, que mimetizan más adecuadamente el patrón de consumo habitual por parte de los seres humanos, los resultados de este consumo son mucho más complejos. Recordemos que en cuanto a los efectos conductuales de nuestros tratamientos observamos que la coadministración de THC y MDMA causa una mayor degradación de la memoria de trabajo de las hembras y de la capacidad de atención de ambos sexos que cuando se trata a los animales con una de estas drogas por separado. Otros autores han visto que el THC podría de alguna manera contrarrestar los efectos ansiogénicos de la MDMA (Shen *et al.*, 2011; Morley *et al.*, 2004), mientras que nosotros no encontramos ninguna interacción entre la MDMA y el THC en el LCE. Así pues, en nuestro caso, la normalización de la expresión del SERT producida por la combinación de THC y MDMA no parece reflejar una “normalización” a nivel

conductual. Los presentes resultados también muestran que la expresión del SERT fue mayor en las hembras control que en los machos control. Se sabe que el sistema serotoninérgico presenta diferencias sexuales; por ejemplo, Ortiz *et al.* (1988) descubrieron que las mujeres presentan unos mayores niveles plasmáticos de serotonina que los hombres y Mitsushima *et al.* (2006) observaron que las ratas macho exhibían unos mayores niveles de serotonina que las hembras en la amígdala basolateral, posiblemente debido a una tasa de síntesis más elevada en los machos en varias regiones cerebrales, incluyendo el córtex parietal (Nishizawa *et al.*, 1997). Nuestros resultados demuestran que las hembras control tienen una mayor densidad de fibras SERT+ en el córtex parietal, lo que apoya estudios previos en seres humanos (Staley *et al.*, 2001).

En lo referente a los resultados de la expresión del receptor CB1, no observamos efectos significativos del tratamiento farmacológico en los machos, mientras que en las hembras pudimos apreciar un claro efecto “escalera” en el que el grupo expuesto a ambas drogas exhibió la menor expresión de receptor CB1. Como hemos indicado más arriba, observamos el mismo efecto de los tratamientos sobre el índice de discriminación en el test de memoria realizado, el NOT. Dado que la memoria de trabajo está estrechamente vinculada con la función hipocampal (Clarke *et al.*, 2008) y el SEC está involucrado en procesos relacionados con la cognición (Rubino y Parolaro, 2011), podemos concebir que la marcada reducción del número de receptores CB1 en el hipocampo de los animales expuestos a THC y/o MDMA esté relacionada con esta alteración de la memoria de trabajo. En relación a la ausencia de efectos sobre CB1 en los machos, estudios previos con protocolos similares han descrito una disminución a largo plazo de la densidad del receptor CB1 en machos tras un tratamiento crónico con THC durante la adolescencia (Rubino *et al.*, 2008) y en la presente Tesis Doctoral se ha descrito un resultado similar tras un tratamiento crónico con CP-55,940 en ratas adolescentes. La discrepancia entre estos datos y los encontrados en el presente estudio podría deberse, al menos en parte, a la manipulación previa a la que fueron sometidos los animales en este experimento, como por ejemplo la batería de pruebas conductuales.

3. LA ANANDAMIDA Y EL 2-ARAQUIDONILGLICEROL MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE MIEDO CONDICIONADO EN SENTIDOS OPUESTOS

El presente estudio se centró en investigar las consecuencias de un incremento, mediante métodos farmacológicos, de la señalización de anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) en la expresión del miedo condicionado. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la degradación de AEA reduce el *freezing*, conducta asociada al miedo en la que el animal se queda paralizado, mediante un mecanismo dependiente tanto del receptor CB1 como del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1, del inglés *Transient Receptor Potential vanilloid 1*). La inhibición de la degradación de 2-AG, sin embargo, promueve el *freezing*, de una manera similar a la acción del agonista del receptor CB1 CP, y este efecto fue dependiente de la expresión de receptores CB1 en neuronas GABAérgicas.

En la actualidad, existe un gran número de trabajos que han demostrado la existencia de una relación entre el grado de aversión de un test conductual y los sistemas endocannabinoide y endovaniloide en la regulación del miedo y de la ansiedad (Marsch *et al.*, 2007; Naidu *et al.*, 2007; Haller *et al.*, 2004), incluyendo la expresión del miedo condicionado (Kamprath *et al.*, 2009). Dado su potencial para ser explotados como diana terapéutica para el tratamiento del trastorno por estrés postraumático (PTSD, del inglés *Post-traumatic stress disorder*; Trezza y Campolongo, 2013), decidimos investigar de manera sistémica las consecuencias de la modificación de la señalización tanto del SEC como del sistema endovaniloide sobre la respuesta a un miedo de grado elevado. Para ello, establecimos un protocolo de miedo condicionado auditivo que permitió por un lado provocar una respuesta del SEC [mediante un *shock* eléctrico mayor de 0,7 mA; ver para más información Kamprath *et al.* (2009)] y por el otro una respuesta de *freezing* sostenida frente a un tono, es decir, que no decayera a lo largo de toda la fase de extinción. De acuerdo con estudios previos del laboratorio del Dr Carsten Wotjak, la presentación de tonos auditivos de larga duración durante la fase de extinción del miedo permiten mantener las respuestas de *freezing* en unos niveles relativamente estables a lo largo del curso de exposiciones repetidas (Plendl y Wotjak, 2010). Así, el primer experimento del Bloque 5 de la presente Tesis Doctoral estuvo dirigido a establecer y poner a punto un modelo animal de *freezing* sostenido a lo largo

de varios días de extinción. Observamos que la mayor intensidad de *shock* testada, provocó una respuesta de miedo por encima del 50% de *freezing* durante 3 días consecutivos de extinción. Por esta razón decidimos seguir con este modelo para los sucesivos experimentos.

Este modelo nos permitió analizar los efectos de un tratamiento tanto en agudo (día 1) como tras varios días de tratamiento (días del 1 al 3), así como observar las consecuencias a largo plazo del tratamiento farmacológico (día 10). Todos los animales recibieron un tratamiento con vehículo, no sólo durante el establecimiento y caracterización del protocolo de condicionamiento, sino también antes de la re-exposición al tono a día 10. Cabe destacar que el tiempo que transcurre entre la administración del tratamiento y el inicio de la fase de extinción parece afectar las respuestas de *freezing*. En el caso de los tratamientos con URB597 o JZL184, los ratones fueron inyectados 2 horas antes de la re-exposición al tono para asegurar un correcto bloqueo de las enzimas de degradación de los endocannabinoides (Micale *et al.*, 2013). Bajo tales circunstancias, los controles tratados con vehículo mostraron una marcada disminución del porcentaje de *freezing* a lo largo de la presentación del tono. Sin embargo, la respuesta observada 30 minutos después de la administración del tratamiento farmacológico fue la esperada inicialmente, cuando propusimos este modelo animal, es decir, durante la extinción la respuesta de *freezing* que mostraron los animales fue sostenida y no decayó a lo largo de la fase de extinción. Actualmente tan sólo podemos especular sobre las razones de esta diferencia, la cual podría involucrar la activación de la señalización endocannabinoide/endovaniloide. Lo que parece claro es que a la hora de interpretar nuestros datos debemos considerar también las diferencias debidas a la administración del tratamiento en la respuesta de *freezing*, incluso cuando su impacto puede parecer poco relevante.

Actualmente se sabe que existe una relación entre el SEC y las respuestas de miedo condicionado. De hecho, el bloqueo de los receptores CB1, bien por métodos farmacológicos (Riebe *et al.*, 2012; Plendl y Wotjak, 2010; Niyuhire *et al.*, 2007; Marsicano *et al.*, 2002), o bien por métodos genéticos (Kamprath *et al.*, 2009) provoca un aumento del *freezing*. La respuesta de miedo sostenida observada en el presente estudio podría de hecho deberse a una activación insuficiente de los receptores CB1 (Moreira y Wotjak, 2010). Alternativamente, podría asociarse también a un incremento

de la activación de los receptores CB2 y/o de TRPV1 ya que se ha observado que tanto los receptores CB2 (Tambaro y Bortolato, 2012) como TRPV1 (Moreira *et al.*, 2012) promueven conductas de miedo y/o ansiogénicas. En nuestro estudio desechamos tal posibilidad dado que no observamos ninguna disminución de la respuesta de miedo tras la administración de un antagonista de TRPV1, el SB366791, mientras que el bloqueo del receptor CB2, empleando el antagonista AM630, causó tan sólo una ligera disminución del miedo a día 1, aunque sin efectos significativos los siguientes días de extinción (días 2 y 3). Por otro lado, la administración del agonista del receptor CB2, el JWH133, no produjo ningún efecto sobre la respuesta de *freezing*. En vista de tales resultados, podríamos sugerir que la aparición de la respuesta de *freezing* sostenida en el tiempo que obtenemos con el modelo animal actual se produce por una activación insuficiente del receptor CB1, mientras que no existe una importante contribución de los receptores CB2 y TRPV1. En línea con esta conclusión, el antagonista/ agonista inverso del receptor CB1, el SR141617, no produjo un aumento de la respuesta de miedo (excepto por un ligero incremento a día 2 tras el condicionamiento), lo que contrasta con observaciones previas utilizando intensidades de *shock* menores (Riebe *et al.*, 2012; Plendl y Wotjak, 2010; Kamprath *et al.*, 2006, 2009; Niyuhire *et al.*, 2007; Marsicano *et al.*, 2002). Sin embargo, y en contra de nuestras expectativas, la administración de CP, que como ya hemos mencionado anteriormente es un agonista del receptor CB1, no sólo no produjo una disminución del *freezing*, sino que además lo promovió. Este fue el caso de la mayor dosis empleada (50 µg/kg), mientras que una dosis menor (1 µg/kg) no afectó a la respuesta de miedo condicionado. Utilizando el campo abierto descartamos que el incremento del *freezing* fuera debido a una disminución generalizada de la actividad locomotora, efecto secundario conocido de los cannabinoides exógenos y que ya observamos previamente en el primer experimento de la presente Tesis Doctoral. Interesantemente, en un reciente estudio de nuestro grupo hemos descrito las consecuencias ansiogénicas vs ansiolíticas de exactamente estas dos mismas dosis de CP. En este trabajo se vio que los efectos divergentes del CP sobre la ansiedad se deben a la participación bien de receptores CB1 en terminales GABAérgicos o bien a los situados en terminales glutamatérgicos (Rey *et al.*, 2012). Este hecho nos llevó a plantearnos si el incremento de la respuesta de miedo debida a un aumento de la activación del receptor CB1 pudiera diferir según la población neuronal que se encuentre implicada. Sin embargo, también puede haber ocurrido que los efectos del CP

sobre la respuesta de miedo puedan ser el resultado de una activación de receptores CB1 en áreas cerebrales sin ninguna participación en la expresión de miedo condicionado, y por tanto, representar un efecto farmacológico secundario. Por este motivo, quisimos demostrar si un incremento de la activación del receptor CB1 podría aumentar la respuesta de *freezing* ante la exposición al tono también mediante la inducción de un aumento del tono cannabinoide, es decir mediante una aproximación más fisiológica. Por este motivo, manipulamos sistémicamente la disponibilidad de los dos endocannabinoides mejor conocidos, la AEA y el 2-AG y estudiamos las consecuencias de estos tratamientos sobre la expresión de miedo condicionado. A partir de ese estudio obtuvimos los siguientes resultados:

1. Que el inhibidor de la recaptación de endocannabinoides AM404, pero no el VDM11, convirtió la respuesta de *freezing* sostenida en una respuesta decreciente.
2. Que el bloqueo de la degradación de la AEA mediante la administración de URB597 también produjo una disminución de la expresión de miedo condicionado.
3. Que, al contrario de lo que esperábamos, el bloqueo de la degradación de 2-AG, gracias al compuesto JZL184, promovió la expresión de miedo de una manera similar a lo observado tras la administración de CP.

Ha sido descrito previamente que el URB597 provoca una disminución de la respuesta de miedo condicionada [Busquets-García *et al.*, 2011; ver para revisión Micale *et al.* (2013) y Riebe *et al.* (2012)]. Así, se ha visto que el aumento de los niveles de AEA atenúa la respuesta de *freezing* (Gunduz-Cinar *et al.*, 2013). En nuestro caso, observamos efectos a largo plazo del URB597 ya que encontramos una disminución del *freezing* 10 días después del condicionamiento, día en el que los animales fueron tratados con vehículo. Este efecto podría deberse a que el tratamiento farmacológico haya causado un aumento de la eficiencia de los procesos de extinción que provocara una extinción a largo plazo de la memoria de miedo a través de procesos de habituación y de reaprendizaje. Se ha visto que el URB597 es un inhibidor irreversible de la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*) (Kathuria *et al.*, 2003), y la actividad de la FAAH no vuelve a restablecerse completamente hasta 10 días después de una única administración de AM3506, otro inhibidor irreversible de la FAAH (Gunduz-Cinar *et al.*, 2013). Por tanto, no podemos

descartar que los efectos bioquímicos de las 3 inyecciones de URB597 (del día 1 al día 3 tras el condicionamiento, 1 mg/kg/día) se mantengan a día 10, lo que provocaría un aumento de disponibilidad de AEA también durante este día, y, en consecuencia, una disminución del *freezing*, de una manera similar a lo observado durante las fases de extinción previas.

La administración de AM404 provocó el mismo comportamiento que el tratamiento agudo de URB597 lo que sugiere que su actividad está primordialmente relacionada con el bloqueo de la recaptura de AEA más que de 2-AG. Esta interpretación viene apoyada por el hecho de que el AM404 produce un bloqueo sobre el recién descubierto transportador derivado de la FAAH específico para la AEA, el cual se ha visto que es responsable de la recaptura de AEA, pero no de 2-AG (Fu *et al.*, 2012). Sin embargo, el VDM11, otro inhibidor de la recaptura de endocannabinoides que se ha observado que también produce un bloqueo similar al del AM404 sobre este transportador específico (Fu *et al.*, 2012) no causó ningún efecto sobre la respuesta de *freezing*. Actualmente, no podemos discernir si esta discrepancia está relacionada con la dosis empleada, los efectos secundarios sobre la actividad locomotora o diferencias en el bloqueo de la recaptura de AEA frente a la de 2-AG. Lo que sí se sabe es que el AM404 produce también una inhibición de la recaptura de 2-AG (Wiskerke *et al.*, 2012; Bisogno *et al.*, 2001; Beltramo y Piomelli, 2000), aunque mediante mecanismos aún desconocidos (Fowler, 2012). Los efectos opuestos del aumento de los niveles de AEA y 2-AG observados en el presente estudio sugieren un bloqueo de los efectos aliviadores del miedo frente a los que los promueven (en el caso del VDM11) o una preponderancia del incremento de los niveles de AEA (en el caso del AM404). Además, las consecuencias conductuales del AM404 podrían ser el resultado no sólo de un incremento de la activación del receptor CB1, sino también de una activación de TRPV1, dado que la AEA se une a ambos receptores (Di Marzo y De Petrocellis, 2012). En línea con este razonamiento, utilizamos antagonistas del receptor CB1 (SR141617) y del TRPV1 (SB366791) antes de la administración de AM404 para conocer cuál de estos receptores podía encontrarse implicado en los efectos aliviadores del miedo provocados por este inhibidor de la recaptación. Tanto SR141617 como SB366791 bloquearon la disminución del *freezing* causada por AM404, por lo que podemos concluir que ambos receptores participan en la disminución de la respuesta de miedo condicionado. Esta observación amplía la concepción actual sobre los efectos de tipo *yin-yang* de los

receptores CB1 y TRPV1 sobre los efectos opuestos que ambos receptores tienen sobre las respuestas de miedo y de ansiedad (Moreira *et al.*, 2012). Así, con el presente estudio demostramos que el incremento de la actividad de ambos receptores, i.e. CB1 y TRPV1, podría causar efectos en el mismo sentido, promoviendo, en nuestro caso, la disminución en agudo de las respuestas de miedo condicionado, lo cual podría también explicar por qué fuimos incapaces de promover una disminución de la respuesta de miedo tras la administración de OMDM198, otro inhibidor de la FAAH, que además actúa como antagonista del TRPV1 (Maione *et al.*, 2013).

El aumento de la respuesta de *freezing* provocada por el inhibidor de la monoacilglicerol lipasa (MAGL), el JZL184 demostraría, por primera vez, que el aumento de disponibilidad de 2-AG promueve la expresión de miedo condicionado. En estudios previos se ha observado que el JZL184 podría producir hipolocomoción, uno de los efectos de la tétroda cannabinoide (Long *et al.*, 2009), y que es fácilmente confundible con un aumento de la inmovilidad o *freezing*. Sin embargo, los resultados obtenidos en el campo abierto tras el tratamiento de los animales con las dosis empleadas en el presente estudio (4 y 8 mg/kg) demuestran que este fármaco no produce, a las dosis seleccionadas, ninguna alteración de la actividad locomotora. Es posible que el JZL184 produzca una disminución de la locomoción a dosis más elevadas [16 mg/kg, Long *et al.* (2009)] que las empleadas en el presente trabajo. Esto mismo podría explicar por qué no conseguimos observar el desarrollo de tolerancia al tratamiento farmacológico tal como ha sido descrita en trabajos previos [40 mg/kg/día durante 6 días; Schlosburg *et al.* (2010)], lo que coincide con el estudio de Busquets-García *et al.* (2011) en el que emplearon una dosis de 8 mg/kg/día durante 6 días seguidos. En nuestro estudio, el tratamiento con 4 mg/kg/día durante 3 días consecutivos con JZL184 provocó una alteración de la respuesta de miedo incluso durante el tercer día de tratamiento. De hecho, los efectos del JZL184 fueron incluso más pronunciados tras la repetición del tratamiento. Es tentador asociar tales efectos con el incremento de la síntesis de 2-AG que ha sido observado tras la exposición repetida a un factor estresante homotípico (Hill *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2005). De acuerdo con esto, la acción del JZL184 sería aún más efectiva en situaciones en las que la síntesis de 2-AG se encuentre aumentada. El incremento de la respuesta de miedo provocada por el JZL184 parece estar en contradicción con sus consecuencias ansiolíticas (Aliczki *et al.*, 2013; Almeida-Santos *et al.*, 2013; Busquets-García *et al.*, 2011; Kinsey *et al.*, 2011;

Sciolino *et al.*, 2011). Aparentemente, el 2-AG afecta de manera distinta a la expresión aguda de miedo condicionado y a la ansiedad en pruebas conductuales de ansiedad basadas en la exploración. Así, los efectos ansiolíticos del JZL184 han sido descritos para dosis a partir de 8 mg/kg, mientras que los efectos más destacados sobre la conducta de miedo se observaron con una dosis de 4 mg/kg. Además, los efectos ansiolíticos del 2-AG parecen estar mediados, al menos en parte, por receptores CB2 (Almeida-Santos *et al.*, 2013; Busquets-García *et al.*, 2011), mientras que los efectos sobre el miedo dependieron de la activación de los receptores CB1 y TRPV1.

Por último, nos quedaba pendiente conocer cuáles son los mecanismos implicados en la promoción de la conducta de miedo provocada por el 2-AG. Para contestar a esta pregunta empleamos ratones con mutaciones condicionales en las que la expresión del receptor CB1 se encuentra bloqueada bien en neuronas glutamatérgicas corticales (Glu-CB1-KO) o bien en neuronas GABAérgicas del prosencéfalo (GABA-CB1-KO). Los análisis conductuales de los mutantes *knock-out* (KO) tratados con vehículo y de los controles salvajes o *wild-type* confirmaron lo que había sido descrito previamente: un aumento del miedo condicionado en los animales Glu-CB1-KO (Metna-Laurent *et al.*, 2012; Kamprath *et al.*, 2009) y una disminución en los animales GABA-CB1-KO (Metna-Laurent *et al.*, 2012). Este resultado demostraría que los endocannabinoides producen una disminución de las respuestas de miedo a través de los receptores CB1 en terminales glutamatérgicos, mientras que promueven la expresión del miedo a través de los receptores CB1 en neuronas GABAérgicas. Este efecto *yin-yang* de la acción de los endocannabinoides sobre el miedo condicionado en ambas poblaciones neuronales ha sido descrito también para la ansiedad (Rey *et al.*, 2012) las conductas de búsqueda de la novedad (Lafenêtre *et al.*, 2009), la ingesta de alimentos (Bellocchio *et al.*, 2011) y el aprendizaje por aversión (Metna-Laurent *et al.*, 2012). En línea con los resultados que sugieren que el aumento de la respuesta de miedo estaría mediada por receptores CB1 en neuronas GABAérgicas, el incremento de la respuesta de *freezing* provocada por el aumento de los niveles de 2-AG fue completamente abolido en los animales GABA-CB1-KO. También observamos una ausencia de efectos del JZL184 en los animales Glu-CB1-KO; sin embargo, este dato es poco concluyente dado que estos animales presentaron unos niveles de *freezing*, cuando fueron tratados sólo con vehículo, ya de por sí muy elevados, lo que podría ocultar un aumento del incremento de la respuesta de miedo condicionado. Estudios tanto histológicos como electrofisiológicos demuestran la

participación del 2-AG en la regulación de la transmisión GABAérgica como mensajero retrógrado (Luchicchi y Pistis, 2012; Alger y Kim, 2011; di Marzo, 2011). Por ejemplo, es conocida la existencia de MAGL, pero no de FAAH, en neuronas inhibitorias (Uchigashima *et al.*, 2011; Gulyas *et al.*, 2004). También sabemos que no se produce despolarización inducida por supresión de la inhibición (DSI, del inglés *Depolarization-induced Suppression of Inhibition*) si la síntesis de 2-AG se ve abolida mediante técnicas genéticas (Yoshino *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2010; Tanimura *et al.*, 2010), y al contrario, un incremento de los niveles de 2-AG provocado por una atenuación tanto farmacológica como genética de los procesos de degradación produce una DSI persistente (Pan *et al.*, 2011; Hashimotodani *et al.*, 2007; Kim y Alger, 2004).

Para concluir, podemos resumir los hallazgos del presente estudio mediante el siguiente escenario hipotético: los endocannabinoides ejercerían un control bidireccional de las respuestas agudas de miedo. Por un lado, la disminución de las respuestas de miedo se produce a través de la AEA, que provoca una regulación aguda a la baja de la transmisión glutamatérgica (Riebe *et al.*, 2012). La síntesis y liberación de AEA parece depender del grado de aversión de la situación. Una disminución de los niveles de AEA provocaría la llegada de glutamato a zonas externas a la hendidura sináptica debido a una excesiva liberación de este neurotransmisor, donde se uniría y activaría receptores metabotrópicos de glutamato expresados en zonas extrasinápticas (Hill *et al.*, 2010; Moreira y Wotjak, 2010; Katona y Freund, 2008) que provocarían un incremento de la conducta de miedo. En situaciones altamente aversivas, los efectos aliviadores del miedo de la AEA se encontrarían limitados por procesos de recaptación y degradación, que restringirían la biodisponibilidad del endocannabinoide. De esta manera, inhibidores del transportador derivado de la FAAH, como por ejemplo el AM404, o de la enzima FAAH, como el URB597, promoverían un alivio sintomático agudo del miedo, particularmente ante situaciones con un grado de aversión extremadamente elevado. Este proceso incluiría la activación tanto de receptores CB1 como de TRPV1. Por otro lado, el bloqueo de la MAGL mediante el JZL184 aumenta los niveles de 2-AG, el cual se uniría preferencialmente a receptores CB1 situados en neuronas GABAérgicas. La reducción resultante del tono inhibitorio causaría un incremento de la respuesta de miedo (Heldt *et al.*, 2012). Sorprendentemente, el bloqueo farmacológico del receptor CB1, que cabría esperar que impidiera el incremento de la respuesta de miedo promovido por la señalización de 2-AG, no produce un alivio del

miedo. Para explicar este aparente rompecabezas podríamos hipotetizar que el 2-AG es sintetizado predominantemente en las espinas dendríticas de sinapsis excitatorias (Uchigashima *et al.*, 2011; Suárez *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2006). El férreo control al que estaría sometida la señalización del 2-AG, mediante rápidos procesos de recaptura y degradación realizados en los terminales presinápticos proximales, prevendría la difusión del 2-AG a receptores CB1 expresados en neuronas GABAérgicas distantes (por ejemplo, en el caso de una señalización heterosináptica). La inhibición de la degradación de 2-AG permitiría la difusión de este ligando cannabinoide a sinapsis GABAérgicas, donde ahora sí podría ejercer sus efectos sobre el miedo condicionado, en este caso, promoviéndolo, lo cual anularía los posibles efectos aliviadores del miedo de las sinapsis glutamatérgicas. De acuerdo con tal escenario, las consecuencias de la promoción del miedo por parte de las neuronas GABAérgicas prevalecen si el agonista del receptor CB1 es administrado directamente. El modelo hipotético que planteamos, sería en todo caso aplicable a la regulación de la respuesta de *freezing*, que es la que hemos evaluado en nuestros experimentos. Sería interesante investigar también la posibilidad de que este modelo pudiera así mismo aplicarse a otras respuestas de miedo tales como cambios en los estados vegetativos o en las conductas de huida.

Los mecanismos de acción del 2-AG frente a la AEA distan todavía de ser del todo comprendidos, así como las estructuras clave de su acción. Sin embargo, el presente estudio nos sugiere algunas ideas al respecto que deberían ser analizadas más en profundidad en estudios futuros en el contexto de potenciales aplicaciones terapéuticas mediante la manipulación farmacológica del SEC.

- Primero, el uso de agonistas del receptor CB1 conlleva el riesgo de promover, más que de aliviar, las respuestas asociadas al miedo.
- Segundo, los endocannabinoides parecen estar implicados diferencialmente en la regulación del miedo. Nuestros resultados sugieren que la AEA podría inhibir conductas asociadas al miedo a través de los receptores de CB1 expresados en neuronas glutamatérgicas, mientras que el 2-AG podría promover el *freezing* a través de los receptores CB1 de los terminales GABAérgicos. En consecuencia, se debería prestar atención a la hora de incrementar selectivamente los niveles de endocannabinoides, y quizá sería conveniente aumentar los de AEA sin modificar los de 2-AG. Esto supone un gran reto dadas las múltiples interacciones que

existen entre la AEA y el 2-AG [ver como ejemplo di Marzo (2011) y Maccarrone *et al.* (2008)].

- El incremento farmacológico de los niveles de AEA podría ser de gran interés para el tratamiento de trastornos psiquiátricos asociados a un miedo exagerado, tales como las fobias, trastorno de pánico y PTSD. La asociación entre polimorfismos genéticos en loci que codifican la FAAH y el CNR1 (genes de la FAAH y el receptor CB1 respectivamente) y un miedo sostenido y la prevalencia de PTSD en seres humanos [Gunduz-Cinar *et al.*, 2013; Heitland *et al.*, 2012; Pardini *et al.*, 2012; Hairi *et al.*, 2009; ver como revisión Hillard *et al.* (2012)] resaltan el valor translacional de los descubrimientos preclínicos y por tanto, la idoneidad de tal enfoque.

4. COMENTARIOS FINALES

Los modelos animales utilizados en este estudio nos han permitido la obtención de resultados que indican que experiencias estresantes durante la infancia y/o el consumo de cannabis durante la edad adolescente pueden producir efectos a largo plazo en comportamientos cognitivos y emocionales, así como en lo relativo a factores neuroendocrinos. De manera conjunta, nuestros resultados sugieren que tanto la SM como el tratamiento adolescente con un agonista cannabinoide podrían aumentar la vulnerabilidad a desarrollar tanto sintomatología psiquiátrica como consumo de otras drogas de abuso y producir además cambios metabólicos. Los datos apoyan la idea de que los astrocitos y los receptores CB1 son dianas cruciales para los efectos a largo plazo tanto de un estrés en etapas tempranas de la vida como del consumo de cannabis durante la adolescencia, y alientan a seguir investigando sobre el significado patofisiológico de la afectación de células gliales cruciales en su interacción con las neuronas para la homeostasis cerebral. Los endocannabinoides promueven la diferenciación astrogial a través de la activación de los receptores CB1 (Aguado et al., 2006) y median en la comunicación neurona-astrocito (Navarrete y Araque, 2008). Nuestros resultados enfatizan la importancia funcional de los astrocitos y su interacción con el SEC en relación a las consecuencias a largo plazo de la exposición adolescente al cannabis.

Los presentes datos demuestran por primera vez que la SM produce alteraciones conductuales y neuroquímicas sexo-dependientes en ratas adolescentes tratadas con MDMA, siendo los machos más sensibles a la SM que las hembras. La SM alteró la CPP producida por MDMA en machos adolescentes, lo que podría, al menos parcialmente, relacionarse las alteraciones observadas en el funcionamiento de sus sistemas serotoninérgico y endocannabinoide. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la exposición a factores estresantes en etapas tempranas de la vida produce cambios a largo plazo en la vulnerabilidad a la adicción en humanos. Alteraciones en el sistema de recompensa durante la adolescencia pueden tener consecuencias significativas en términos de consumo de drogas y el subsiguiente desarrollo de la adicción, dado que los sujetos que exhiben unos menores niveles de gratificación en condiciones basales o tras el consumo de la droga podrían aumentar su consumo para poder percibir sus efectos

gratificantes (Leventhal et al., 2010; Bruijnzeel et al., 2004). Es más, el consumo de drogas durante la adolescencia ha sido repetidamente asociado con un aumento de la vulnerabilidad a desarrollar adicción a drogas (Crews et al., 2007; Chambers et al., 2003). El género y los retos a los que un individuo se haya tenido que enfrentar durante etapas tempranas de la vida son factores que pueden modificar el grado en el que la MDMA produce efectos gratificantes y produce dependencia, y deberían ser tenidos en consideración al tratar individuos que hayan desarrollado algún trastorno relacionado con esta y otras drogas.

Nuestros datos apoyan la evidencia de cambios en la expresión y en la funcionalidad del receptor CB1 cerebral y en la expresión del receptor CB2 en tejido inmune como consecuencia de un estrés en etapas tempranas del desarrollo y de la exposición adolescente a cocaína al igual que interacciones funcionales entre ambas manipulaciones. Es a nuestro juicio interesante señalar aquí que también en el estudio de los efectos de la combinación de la SM con un tratamiento con el agonista cannabinoide se observaron interacciones entre ambos tratamientos, por ejemplo, los animales macho que recibieron los dos tratamientos mostraron una cierta “normalización” de la expresión de CB1 en el hipocampo. Es más, también en el estudio sobre la influencia de la SM en los efectos de la MDMA los datos sugieren (aunque en ese caso de forma indirecta) interacciones funcionales entre ambos tratamientos. Por tanto, todos los datos indican que, efectivamente, al menos para ciertos parámetros de los que hemos estudiado y particularmente en los que se refiere al SEC, la SM interacciona con diferentes drogas de abuso tanto cannabinoides como no cannabinoides. En un sentido más amplio podemos interpretar que la exposición a un evento estresante durante edades tempranas de la vida puede potencialmente modular los efectos de la exposición a drogas de abuso durante la adolescencia.

Estudios previos en animales de experimentación han sugerido que la administración aguda de THC y de MDMA producen alteraciones fisiológicas y conductuales opuestas y que su consumo combinado podría revertir tales efectos deletéreos. Sin embargo, cuando se consumen crónicamente, sus efectos negativos pueden incluso llegar a ser aditivos (Parrott *et al.*, 2007). El modelo animal empleado en este estudio nos ha permitido mostrar los efectos a largo plazo de ambas drogas administradas crónicamente, bien de manera separada o en combinación, en lo que

estimamos que es un modelo más apropiado en relación a los hábitos más comunes de consumo que se observan en los adolescentes en la actualidad. Los presentes resultados señalan que la aparente compensación de efectos en algunos de los parámetros estudiados sólo ocurre poco después de la primera exposición a las drogas (temperatura corporal) mientras que en otros parámetros la combinación de ambas drogas provoca efectos deletéreos mucho más pronunciados (peso corporal y la PPI). Es importante, por tanto, llevar a cabo este tipo de estudios crónicos que se asemejan más a los hábitos de consumo de los adolescentes que los estudios de administración aguda ya que pueden proporcionar una imagen mucho más aproximada de los efectos negativos del policonsumo, particularmente en lo referente al THC y la MDMA. A pesar de que una exposición combinada inicial puede producir algún tipo de equilibrio de los efectos deletéreos de una de las drogas, parece quedar bien claro que, a largo plazo y tras una exposición repetida, las consecuencias pueden ser exactamente las contrarias, es decir, potenciación de efectos deletéreos. La administración durante la adolescencia de THC y/o MDMA produjo también alteraciones a largo plazo sobre parámetros relacionados con la neuroinflamación y sobre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide. En este caso, los efectos más perjudiciales de la combinación de ambas drogas se reflejó especialmente en los efectos sobre el receptor CB1 cannabinoide.

Otra aportación novedosa de esta Tesis Doctoral, desde el punto de vista metodológico ha sido la puesta a punto y caracterización de un modelo animal de miedo cuya respuesta de *freezing*, o respuesta conductual al miedo, no declinara tras varios días de extinción. Este condicionamiento nos permitió testar a los animales durante un periodo lo suficientemente amplio como para analizar el efecto de tratamientos farmacológicos crónicos sobre los procesos de extinción. Respecto a la participación del SEC en el proceso de extinción de la respuesta de miedo, nuestros resultados demuestran por vez primera que el aumento selectivo 2-AG promueve la expresión de respuestas de miedo pasivas a través de los receptores CB1 situados en neuronas GABAérgicas. Estos resultados nos llevan a sugerir que para el tratamiento de trastornos psiquiátricos tales como las fobias, el PTSD o la adicción a drogas no se deberían emplear potenciadores no selectivos de los niveles de endocannabinoides. Es más, nuestros datos demuestran un efecto *yin-yang* de los receptores CB1, que en neuronas GABAérgicas promueven el miedo, mientras que en las glutamatérgicas

alivian esta emoción. Por último, encontramos que el uso del inhibidor de la recaptación de endocannabinoides AM404 parece evitar los efectos de un aumento de los niveles de endocannabinoides en neuronas GABAérgicas, mediante un mecanismo dependiente de los receptores CB1 y TRPV1.

En general, los resultados en esta Tesis Doctoral revelan la existencia de un gran número de diferencias sexuales tanto entre los animales controles como en lo que se refiere a los efectos de los tratamientos. Estos dimorfismos son al menos parcialmente atribuibles directa o indirectamente, a los efectos organizacionales de las hormonas gonadales perinatales durante el periodo crítico de diferenciación sexual del cerebro (McLusky y Naftolin, 1981) y/o a los efectos organizacionales y activacionales durante el periodo periadolescente (Viveros *et al.*, 2011, 2012b), aunque no pueden descartarse factores farmacocinéticos. En todo caso, el sexo, o el género, es un factor crítico que debe ser tenido en cuenta dado que, como muestran los resultados de esta Tesis Doctoral, la naturaleza y la intensidad de los efectos de los diversos tratamientos (ya sean farmacológicos o ambientales) dependen claramente del sexo de los individuos. Una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen a la influencia neuromoduladora del factor sexo sobre los efectos de las drogas de abuso facilitará el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas específicas para cada sexo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Un único episodio de separación materna neonatal (24 horas el día postnatal 9) empleado como modelo animal de estrés en etapas tempranas de la vida, y un tratamiento crónico adolescente con un agonista cannabinoide (un modelo de consumo adolescente de cannabis) causaron efectos deletéreos a largo plazo dependientes del sexo y observables en edad adulta. En los machos, la separación materna redujo la respuesta de ansiedad en el laberinto en cruz elevado, lo que sugiere un incremento de impulsividad, mientras que la exposición adolescente al agonista cannabinoide no produjo efectos conductuales en las pruebas utilizadas, aunque sí incrementó la respuesta adrenocortical a un factor estresante de grado medio. En las hembras, la separación materna no causó efectos significativos en los parámetros analizados, mientras que la exposición adolescente al cannabinoide promovió la aparición de conductas asociadas a la búsqueda de novedad en el tablero con agujeros, y disminuyó la capacidad de atención en el test de la inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto. En su conjunto, los presentes resultados sugieren que un estrés en etapas tempranas del desarrollo y el consumo de cannabis durante la adolescencia podrían incrementar la vulnerabilidad a desarrollar ciertos trastornos psiquiátricos tales como psicosis y abuso de drogas de una manera dependiente del sexo.
2. En cuanto al análisis inmunohistoquímico de estos animales, en los machos la separación materna causó un aumento significativo del número de células GFAP positivas en el hipocampo y, en ciertas regiones, el tratamiento crónico con el agonista cannabinoide tendió a contrarrestar este efecto. Además, el tratamiento con el cannabinoide produjo, en machos control no separados, un aumento significativo del número de células GFAP positivas en la capa polimórfica del giro dentado. Los resultados expuestos indican que los machos fueron más vulnerables que las hembras a los efectos de la separación materna y un tratamiento juvenil con un agonista cannabinoide sobre los astrocitos hipocampales. En lo referente a los receptores cannabinoides CB1, la separación materna causó una disminución de la expresión de este receptor en ambos sexos, mientras que el tratamiento crónico con el agonista

cannabinoide produjo en los machos control no separados una disminución general de la inmunorreactividad por el receptor CB1 en el hipocampo. Los animales macho que recibieron ambos tratamientos exhibieron cierta “normalización” en la expresión de los receptores CB1, lo que indica la existencia de interacciones funcionales entre la separación materna neonatal y la exposición adolescente a un agonista cannabinoide. Los datos apoyan la idea de que los astrocitos y los receptores CB1 son dianas cruciales para los efectos a largo plazo tanto de un estrés en etapas tempranas y del consumo de cannabis durante la adolescencia, e incentiva futuros experimentos sobre el significado patofisiológico de tales fenómenos.

3. La separación materna causó una disminución de los efectos reforzantes de la MDMA en el test de la preferencia condicionada de lugar, tan sólo en las ratas macho, efecto que podría deberse a las alteraciones en los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide observadas en estos animales. De hecho, los machos separados tratados con MDMA exhibieron unos niveles más bajos de serotonina en el estriado y en el córtex y una mayor expresión de receptores CB1 hipocampales que los machos control no separados.
4. Tanto la separación materna como un tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia (modelo de consumo adolescente de cocaína) causaron alteraciones a largo plazo, sexo y región dependientes, en la densidad y la funcionalidad de los receptores CB1 cerebrales. Además, las alteraciones provocadas sobre los receptores CB1 por la administración de cocaína durante la adolescencia fueron diferencialmente influenciadas por el modelo de estrés en etapas tempranas del desarrollo. La separación materna produjo un aumento de la expresión de receptores CB2 en el bazo, mientras que la administración adolescente de cocaína atenuó este efecto; la exposición juvenil a cocaína también causó una disminución de la expresión de receptores CB2 en la médula ósea. Los presentes resultados demuestran la existencia de interacciones entre ambos desafíos.
5. En un modelo animal de consumo adolescente de cannabis y éxtasis, la exposición a THC indujo una alteración de la memoria evaluada mediante el test de

reconocimiento de objetos en los animales hembra adultos, pero no en los machos. En el test de la inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto, los animales tratados con MDMA mostraron una menor intensidad de inhibición prepulso cuando se les presentó el prepulso más intenso (80 dB), mientras que la combinación con THC causó una disminución similar a una intensidad de prepulso de 75 dB.

6. El THC causó una disminución de la expresión hipocampal de Arc en ambos sexos, mientras que en el córtex frontal esta reducción sólo pudo ser apreciada en las hembras. La MDMA produjo una disminución de la inmunorreactividad por pERK 1/2 en el córtex frontal de los machos, pero no en el de las hembras, y el THC disminuyó los niveles de ARNm para la prepro-orexina en el hipotálamo de los machos, aunque este efecto se vio revertido cuando los animales también fueron tratados con MDMA.
7. En lo que respecta a los efectos de estos tratamientos sobre parámetros de neuroinflamación y neurotoxicidad, el THC aumentó significativamente el área teñida con GFAP en ambos sexos. En machos, ambas drogas, bien por separado o en combinación, produjeron un incremento significativo del porcentaje de células microgliales reactivas (Iba-1). En cambio, en las hembras, cada droga, cuando fue administrada por separado, produjo una disminución significativa de este porcentaje, mientras que la combinación de ambas resultó en una “normalización” a valores de los animales control. En los machos la MDMA redujo el número de fibras SERT positivas, el THC causó el efecto opuesto y el grupo que recibió ambos tratamientos no mostró diferencias significativas con el grupo control. En las hembras, la MDMA redujo el número de fibras SERT positivas y la combinación de THC y MDMA revirtió este efecto. El THC produjo una disminución significativa del receptor cannabinoide CB1 en las hembras, efecto que se vio agravado por su combinación con la MDMA.
8. El modelo animal utilizado en este estudio, que mimetiza los hábitos de consumo de cannabis y éxtasis por parte de los adolescentes en la actualidad, nos proporciona una imagen más exacta de las consecuencias deletéreas del policonsumo que los experimentos con tratamientos agudos. Mientras que algunos de los efectos

perjudiciales de una de las drogas puede verse revertido por el uso de la otra tras una exposición inicial, como muestran nuestros datos respecto a la temperatura corporal, tras una exposición repetida, las consecuencias a largo plazo podrían ser exactamente las opuestas, dado que en varios de los parámetros analizados los animales sometidos a ambas drogas fueron los más afectados.

9. A pesar de que la activación de los receptores CB1 provoca efectos aliviadores del miedo, el uso de agonistas exógenos del receptor CB1 puede tener el riesgo de promover más que de aliviar las respuestas de miedo.
10. Los endocannabinoides se encuentran diferencialmente involucrados en la regulación del miedo, siendo la anandamida la que inhibe las respuestas de miedo a través de los receptores CB1 localizados en neuronas glutamatérgicas y el 2-AG el responsable de promover el miedo a través de los receptores CB1 expresados en terminales GABAérgicos. En consecuencia, el incremento farmacológico selectivo de los niveles de anandamida, sin alteraciones en los niveles de 2-AG, podría suponer un potencial adyuvante durante las sesiones de extinción de miedo para el tratamiento de fobias, trastornos de pánico y trastorno por estrés postraumático.

ENGLISH VERSION

Title of the Doctoral Thesis: “Animal models for the study of vulnerability factors in the context of neuropsychiatric disorders and drug addiction”

There are critical periods during development, when an organism, or more particularly its brain, is going through important and radical developmental processes and when certain environmental and pharmacological insults can induce long-term neuroendocrine and behavioral changes. For instance, parent neglect or separation, social stress, physical or sexual abuse, or drug use in these critical phases may lead to the appearance of developmental alterations in diverse neurobiological systems which can promote long-term structural and functional alterations in the brain of animals, including humans. One critical period in which we have focused in this Thesis is the early neonatal period, and in order to analyze it as a period of vulnerability we have chosen the maternal deprivation (MD) procedure as a model of early life stress. In particular, we have chosen a specific MD model that has been well characterized by our group during the last years. It consists in removing mothers from their pups during 24 hours at postnatal day (PD) 9. In contrast with several other animal models of early life stress, there is barely information about the possible modulation that this particular procedure may exert on the long-term effects induced by chronic consumption of drugs of abuse.

Drug use and abuse usually starts during the periadolescent period due, among other factors, to the emotional changes that overwhelm the adolescent brain and the “typical” behaviors that are found during this stage of life, such as novelty seeking, increase of risk-taking behaviors or a higher impulsivity. Maturation and reorganization processes are taken place during adolescence in most neurotransmitter and neuromodulatory systems as well as diverse endocrine systems, and data from experimental studies support the idea that this developmental stage represents another “window of vulnerability”. In fact, the onset of certain neuropsychiatric disorders such as schizophrenia or bipolar disorders and addiction takes place during the adolescent and early adulthood periods.

Drug addiction is a persistent state characterized by a compulsive behavior to seek and use the drug, a loss of control over drug taking, even when its consumption can induce several adverse effects and a negative emotional symptomatology when access to the drug is prevented. The dopaminergic system is thoroughly involved in the development of drug addiction, since most of the drugs induce an extracellular increase of dopamine in the nucleus accumbens; however, there is evidence for the involvement of other neurotransmitter systems such as the serotonergic, GABAergic, opioid and glutamatergic systems. Furthermore, in the last years, several studies have reported an important participation of the endocannabinoid system (ECS) in the acquisition and maintenance of drug abuse behaviors.

The ECS is involved in a great deal of physiological processes such as motor control, analgesia, learning and memory, emotional homeostasis, regulation of the immune system, feeding and energy balance. Regarding its involvement in drug dependence and addiction, experimental studies have shown that genetic or pharmacological modulation of the ECS can induce alterations in the rewarding effects of drugs, and, in turn, diverse drugs of abuse, not only cannabinoids, can trigger noticeable changes in the ECS, i.e. alterations in the level of endocannabinoids or in the expression and/or activity of cannabinoid receptors.

One of the best known problems for the treatment of drug addiction is relapse. Susceptibility to drug relapse is intimately associated with stress and/or a high level of anxiety, negative emotional states which can persist for many months or years during abstinence. Anxiety under stressful circumstances contributes to the evocation of aversive or fearful memories which are also involved in relapse to drug taking behavior and, hence, drug consumption habits. In this respect, it has been shown that the ECS plays an important role in memory extinction processes, which makes it a potential therapeutic target to increase the efficiency of extinction therapy for addiction. Nevertheless, animal models of memory extinction show an important limitation, since chronic treatments cannot be tested on them.

The first objective of this Doctoral Thesis was to find possible interactions between the effects of an early life stress, using MD as animal model, and chronic consumption of drugs during the adolescent period, and their relationship with

neuropsychiatric disorders, including addiction. For this reason, we performed three experiments where we used the drugs of abuse that have been reported to be the most abused by adolescent humans, namely, cannabis, cocaine and ecstasy.

In the first experiment, we submitted male and female animals to MD (24 hours at PD 9) and to a chronic adolescent treatment with the cannabinoid agonist CP-55,940 (CP; 0.4 mg/kg; PD 28–42) to mimic cannabis consumption during adolescence. The behavioral and physiological responses to both treatments were evaluated at adulthood. We tested them in the prepulse inhibition (PPI) of the startle response and analyzed their exploratory activity (holeboard, HB) and anxiety (elevated plus maze, EPM). In addition, we evaluated their adrenocortical reactivity in response to stress and plasma leptin levels. Maternal behavior was measured before and after deprivation. In our hands, MD resulted in enhanced maternal behavior after reuniting the pups with the dam. In adulthood, MD seemed to reduce anxiety or enhance risk-taking behaviors in males whereas adolescent exposure to cannabinoids had no major behavioral effects but did increase hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis responsiveness to intermediate intensity stressors. In females, adolescent cannabinoid exposure appeared to promote novelty-seeking behaviors and decreased attentional capabilities in the adulthood. Novelty-seeking and risk-taking personality traits may increase the probability to self-administer diverse drugs of abuse. Collectively, these results suggest that MD and an adolescent cannabinoid treatment may increase vulnerability to develop certain psychiatric disorders such as psychosis and substance abuse.

The immunohistochemical study of the hippocampus of these animals showed that in males MD induced a significant increase in the number of glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive cells in CA1 and CA3 areas and in the polymorphic layer of the dentate gyrus (DG). In these latter two regions CP treatment tended to counteract the effect of MD. The treatment with CP induced, in control non-deprived males, a significant increase in the number of GFAP+ cells in the polymorphic layer of the DG. As a whole, these results suggest that males were more vulnerable than females to the effects of MD and juvenile cannabinoid treatment on hippocampal astrocytes. As for CB1 cannabinoid receptors, MD induced a decrease in CB1 receptor expression in both males and females. Adolescent cannabinoid exposure induced in non deprived males a general decrease in CB1 receptor immunoreactivity that was most marked in CA1 and

in the polymorphic layer of the DG. In contrast, non-deprived CP-treated females tended to have increased hippocampal CB1 receptor immunoreactivity. Male animals receiving the two treatments showed a certain “normalization” of hippocampal CB1 receptor expression, indicating functional interactions between neonatal MD and adolescent cannabinoid exposure. As for the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) this interaction was also observed since the trend of CP treatment to decrease BDNF was counteracted by MD. The present results further highlight the potential functional importance of astrocytes and its interaction with the ECS in relation to long-term consequences of adolescent cannabis exposure.

In the next experiment, we used the conditioned place preference (CPP) paradigm to address the influence of MD on the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymetamphetamine (MDMA) in adolescent animals of both sexes. The animals were conditioned with 2.5 mg/kg MDMA during the periadolescent period (PD 34-43) and were sacrificed between PD 68 and 75. Our results demonstrate for the first time that MD reduces the rewarding effects of MDMA in a sex-dependent manner, an effect that might be related with the observed alterations in the serotonergic and cannabinoid systems. In fact, a reduction in striatal and cortical serotonin levels and an increased expression of hippocampal CB1 receptors were observed in MDMA-treated MD males.

Finally, we investigated the consequences of MD and/or adolescent cocaine exposure in brain CB1 receptors and CB2 receptors in immune tissues. Control and maternally deprived male and female *Wistar* rats were administered cocaine (8 mg/kg/day) or saline during adolescence (PD 28-42). At adulthood, [^3H]-CP-55,940 autoradiographic binding was employed for the analysis of CB1 receptor density and CP-55,940-stimulated [^{35}S]-GTPgammaS binding for CB1 receptor functionality; CB2 receptor expression was analyzed by Western blotting. Sex differences in CB1 receptor expression and functionality were found, and MD induced important and enduring sex-dependent changes. In addition, the plastic changes induced by adolescent cocaine administration in brain CB1 receptors were differentially influenced by early life events. MD increased spleen CB2 receptor expression while adolescent cocaine administration attenuated this effect; cocaine exposure also diminished CB2 receptor expression in

bone marrow. Present findings provide evidence for functional interactions between both challenges. In many regions, the observed effects were sexually dimorphic.

Our second goal in this Doctoral Thesis was to study the long-term effects of the combined consumption of cannabis and ecstasy during adolescence. For this purpose we treated adolescent male and female Wistar rats with increasing doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC; 2.5, 5, 10 mg/kg; i.p.) between PD 28 and 45 and/or MDMA (two daily doses of 10 mg/kg every 5 days; s.c.), from PD 30 to 45. We found that MDMA induced, in both sexes, a reduction in directed exploration in the HB and increased exploration of the open-arms of the EPM one day after the end of the pharmacological treatment (PD 46). In the long-term, a disruption in cognitive function was observed due to the THC treatment in female but not male rats in the novel object test (NOT). In the PPI, MDMA-treated male and female animals showed a decreased percentage of PPI at the highest intensity of prepulse studied (80 dB), whereas its combination with THC induced a similar decrease at 75 dB. THC decreased hippocampal expression of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) in both sexes while in the frontal cortex this reduction was only found in females. Regarding extracellular signal-regulated kinases (ERK) immunoreactivity, MDMA induced a down-regulation in the frontal cortex of male but not female animals. In the hypothalamus THC decreased prepro-orexin mRNA levels in males and this effect was prevented in animals receiving both drugs. Previous data have suggested that acute THC and MDMA administration may have opposite effects in animals. However, the animal model used in this study mimics the current habits of human adolescence consumption and can provide a more reliable picture of the detrimental consequences of polydrug abuse than acute experiments, particularly regarding THC and MDMA that are co-abused with a very high frequency among adolescents. Whereas some apparent counterbalance of the detrimental effects of one of the two drugs may occur during an initial exposure, such as body temperature; after repeated exposure the long-term consequences seem to be exactly the opposite, i.e. the animals receiving both drugs are the most markedly affected.

When we studied the effect of both treatments on neuroinflammation (glial cells) and serotonergic and cannabinoid systems we found that THC significantly increased GFAP stained area in both sexes. In males, both drugs either separately or in

combination induced a significant increase of the percentage of reactive microglia cells (Iba-1). In contrast, in females, each drug, when administered alone, produced a significant decrease of this percentage, whereas the combination of both drugs resulted in a “normalization” to control values. In males, MDMA reduced the number of serotonin transporter positive (SERT+) fibres, THC induced the opposite effect and the group receiving both drugs did not significantly differ from the controls. In females, MDMA reduced the number of SERT+ fibres and the combination of both drugs counteracted this effect. Regarding CB1 receptor, THC induced a significant reduction of this receptor in females and this effect was aggravated by the combination with MDMA.

Finally, we aimed to characterize an animal model of fear whose freezing response, a fear-related behavior, would not decline after several days of extinction training. For this purpose, on conditioning day, animals were submitted to a high aversive stimulus, i.e. a 1.5 mA electric shock, and thereafter to an extinction protocol where the neutral stimulus was continuously presented, i.e. tone exposure during 3 minutes. This new conditioning and extinction task, allowed us to test the animals along a period that was long enough to analyze chronic pharmacological effects over the extinction process (drug administration before extinction training on the first, second and third day after conditioning). To investigate the involvement of the ECS, we treated the animals with several modulators of this neurotransmitter system. Our results demonstrate for the first time that selective enhancement of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) signaling promotes the expression of passive fear responses via CB1 receptor on GABAergic neurons. Hence, the design of pharmacological interventions to treat psychiatric disorders such as phobias, post-traumatic stress disorder (PTSD), or drug addiction should not use non-selective endocannabinoid signaling enhancers. Moreover, our data demonstrate “yin-yang” involvement of CB1 receptors on GABAergic (fear promoting) *vs* glutamatergic (fear alleviating) neurons. Finally, we found that interference with endocannabinoid uptake by AM404 seemed to bypass enhanced endocannabinoid signaling in GABAergic neurons, by a mechanism involving the activation of both, CB1 and TRPV1 receptors.

Below we highlight several “take home messages” that we consider as particularly important contributions of this Doctoral Thesis:

- Stressful experiences during developmental critical periods can modulate the effects of chronic adolescent drug consumption, i.e. cannabis, cocaine and ecstasy.
- Combined ecstasy and cannabis administration induces long-term negative effects. Animal models that mimic human consumption patterns provide more reliable information than acute experiments.
- Sex/gender is an extremely important factor that should be taken into consideration since, as we show in our experiments, the nature and intensity of the diverse treatment effects are highly dependent on the sex of the animals.
- Adolescent exposure to drugs of abuse induces deleterious effects in glial cells. This long-term impact on a cell-type whose interaction with neurons is vital for brain homeostasis helps us to understand the devastating effects of drug addiction.
- Not only CB1 receptor expression can be altered due to a pharmacological or environmental treatment, but also its activity. For this reason evaluation of receptor density and distribution as well of its functionality is highly recommended to have a more reliable picture of the nature of the effects of such manipulations.
- Enhancement of 2-AG signaling promotes the expression of passive fear responses via CB1 on GABAergic neurons. In this context, pharmacological interventions to treat psychiatric disorders such as phobias, PTSD or drug addiction should avoid the use of non-selective endocannabinoid signaling enhancers.

List of original articles containing the results obtained in this Doctoral Thesis:

Llorente-Berzal A, Fuentes S, Gagliano H, López-Gallardo M, Armario A, Viveros MP, Nadal R (2011). Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16:624-37.

López-Gallardo M, López-Rodríguez AB, **Llorente-Berzal Á**, Rotllant D, Mackie K, Armario A, Nadal R, Viveros MP (2012). Maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure impact hippocampal astrocytes, CB1 receptors and brain-derived neurotrophic factor in a sexually dimorphic fashion. *Neuroscience* 204:90-103.

Llorente-Berzal A, Manzanedo C, Daza-Losada M, Valero M, López-Gallardo M, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Viveros MP (2013). Sex-dependent effects of early maternal deprivation on MDMA-induced conditioned place preference in adolescent rats: possible neurochemical correlates. *Toxicology* 311:78-86.

Llorente-Berzal A, Assis MA, Rubino T, Zamberletti E, Marco EM, Parolaro D, Ambrosio E, Viveros MP (2013). Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure. *Pharmacol Res* 74:23-33.

Llorente-Berzal A, Puighermanal E, Burokas A, Ozaita A, Maldonado R, Marco EM, Viveros MP (2013). Sex dependent psychoneuroendocrine effects of THC and MDMA in an animal model of adolescent drug consumption. *Plos One*. In press.

López-Rodríguez AB, **Llorente-Berzal A**, Garcia-Segura L, Viveros M (2013). Sex dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. *Br J Pharmacol*. In press.

Llorente-Berzal A, Terzian ALB, Viveros MP, Wotjak CT (2013). Pharmacological enhancement of anandamide and 2-AG levels modifies the expression of conditioned fear in opposite directions. *Neuropsychopharmacology*. Submitted.

The following conclusions can be drawn from this Thesis:

1. A single episode of neonatal maternal deprivation (24h at postnatal day 9), employed as a model of early life stress, and a chronic adolescent treatment with a cannabinoid agonist (a model of adolescent cannabis consumption) induced sex-dependent long term deleterious effects observable in the adulthood. In males, maternal deprivation reduced anxiety-related responses in the elevated plus-maze, suggesting enhanced impulsivity, whereas adolescent cannabinoid exposure had no major behavioral effects but did increase adrenocortical responsiveness to intermediate intensity stressors. In females, maternal deprivation did not induce significant effects on the parameters analyzed, whereas adolescent cannabinoid exposure promoted novelty-seeking behaviors in the holeboard and decreased attentional capabilities as measured in the prepulse inhibition test. Collectively, these effects suggest that early life stress and adolescent cannabinoid consumption could increase, in a gender dependent manner, vulnerability to develop certain psychiatric disorders such as psychosis and substance abuse.
2. As for the immunohistochemical analysis of these animals, in males MD induced a significant increase in the number of hippocampal GFAP positive cells and, in certain regions, the adolescent chronic agonist treatment tended to counteract this effect. In addition, the cannabinoid treatment induced, in control non-deprived males, a significant increase in the number of GFAP positive cells in the polymorphic layer of the dentate gyrus. As a whole, these results suggest that males were more vulnerable than females to the effects of maternal deprivation and juvenile cannabinoid treatment on hippocampal astrocytes. As for CB1cannabinoid receptors, maternal deprivation induced a decrease in CB1 receptor expression in both sexes and adolescent cannabinoid exposure induced in control non-deprived males a general decrease in hippocampal CB1 receptor immunoreactivity. Male animals receiving the two treatments showed a certain “normalization” of hippocampal CB1 receptor expression, indicating functional interactions between neonatal maternal deprivation and adolescent cannabinoid exposure. The data support the idea that astrocytes and CB1 receptors are crucial targets for long-lasting effects of both early-life stress and

adolescent cannabis use, and encourage further research on the pathophysiological significance of these phenomena.

3. Maternal deprivation reduced the rewarding effects of adolescent MDMA in the conditioned place preference test, only in males, an effect that might be related with the alterations in the serotonergic and cannabinoid systems that were also observed in these animals. In fact, a reduction of striatal and cortical serotonin levels and an increased expression of hippocampal CB1 receptors were observed in MDMA-treated deprived males.
4. Both, maternal deprivation and an adolescent chronic cocaine treatment (a model of adolescent cocaine consumption) induced long-term sex- and region-dependent changes in the density and functionality of brain CB1 receptors. In addition, the plastic changes induced by adolescent cocaine administration in brain CB1 receptors were differentially influenced by early life stress. Maternal deprivation increased spleen CB2 receptor expression while adolescent cocaine administration attenuated this effect; cocaine exposure also diminished CB2 receptor expression in bone marrow. Present findings provide evidence for functional interactions between both challenges.
5. In a model of adolescent THC and ecstasy consumption patterns, THC administration induced a long-term disruption of memory in the novel object test in female but not in male rats. In the prepulse inhibition test, MDMA-treated animals showed a decrease in prepulse inhibition at the most intense prepulse studied (80 dB), whereas in combination with THC it induced a similar decrease at 75 dB.
6. THC decreased hippocampal Arc expression in both sexes, while in the frontal cortex this reduction was only evident in females. MDMA induced a reduction in ERK 1/2 immunoreactivity in the frontal cortex of male but not female animals, and THC decreased prepro-orexin mRNA levels in the hypothalamus of males, although this effect was prevented when the animals also received MDMA.

7. Regarding the effects of these treatments on neuroinflammation and neurotoxicity related parameters, THC significantly increased GFAP stained area in both sexes. In males, both drugs either separately or in combination induced a significant increase of the percentage of reactive microglia cells (Iba-1). In contrast, in females, each drug, when administered alone produced a significant decrease of this percentage, whereas the combination of both drugs resulted in a “normalization” to control values. In males, MDMA reduced the number of SERT positive fibres, THC induced the opposite effect and the group receiving both drugs did not significantly differ from the controls. In females, MDMA reduced the number of SERT positive fibres and the combination of both drugs counteracted this effect. THC induced a significant reduction of CB1 cannabinoid receptors in females and this effect was aggravated by the combination with MDMA.
8. The animal model used in this study, which mimics the current habits of human adolescence consumption of cannabis and ecstasy, provides a more reliable picture of the detrimental consequences of polydrug abuse than acute experiments. Whereas some apparent counterbalance of the detrimental effects of one of the two drugs may occur during an initial exposure, as observed for body temperature, after repeated exposure the long-term consequences might be exactly the opposite, since in several parameters the animals receiving both drugs were the most markedly affected.
9. Although physiological CB1 receptor activation may induce fear alleviating effects, the use of exogenous CB1 receptor agonists bears the risk to promote, rather than to alleviate, fear responses.
10. Endocannabinoids are differentially involved in fear regulation with anandamide inhibiting fear responses via CB1 receptors located in glutamatergic neurons and 2-AG promoting fear via CB1 receptor expressed in GABAergic terminals. In consequence, pharmacological selective increase of the anandamide signaling, without changes in 2-AG levels, could be used as an effective adjuvant during extinction trainings for the treatment of fear-related disorders such as phobias, panic disorder and PTSD.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaron S, McMahon JM, Milano D, Torres L, Clatts M, Tortu S, Mildvan D, Simm M (2008). Intranasal transmission of hepatitis C virus: virological and clinical evidence. *Clin Infect Dis* 47:931-4.
- Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y (2003). Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* 45:106-15.
- Adamczyk P, McCreary AC, Przegalinski E, Mierzejewski P, Bienkowski P, Filip M (2009). The effects of fatty acid amide hydrolase inhibitors on maintenance of cocaine and food self-administration and on reinstatement of cocaine-seeking and food-taking behavior in rats. *J Physiol Pharmacol* 60:119-25.
- Adinoff B, Devous MD, Best SM, George MS, Alexander D, Payne K (2001). Limbic responsiveness to procaine in cocaine-addicted subjects. *Am J Psychiatry* 158:390-8.
- Afifi TO, Enns MW, Cox BJ, Asmundson GJ, Stein MB, Sareen J (2008). Population attributable fractions of psychiatric disorders and suicide ideation and attempts associated with adverse childhood experiences. *Am J Public Health* 98:946-52.
- Agrawal A, Neale MC, Prescott CA, Kendler KS (2004). Cannabis and other illicit drugs: comorbid use and abuse/dependence in males and females. *Behav Genet* 34:217-28.
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006). The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 26:1551-61.
- Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev* 59:253-77.
- Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 101:1020-7.
- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2009). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 19:1222-31.
- Alger BE, Kim J (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci* 34:304-15.
- Aliczki M, Zelena D, Mikics E, Varga ZK, Pinter O, Bakos NV, Varga J, Haller J (2013). Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CD1 mice. *Horm Behav* 63:752-8.
- Almeida-Santos AF, Gobira PH, Rosa LC, Guimaraes FS, Moreira FA, Aguiar DC (2013). Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 252:10-7.

- Amano T, Unal CT, Paré D (2010). Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nat Neurosci* 13:489-94.
- Andero R, Heldt SA, Ye K, Liu X, Armario A, Ressler KJ (2011). Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning. *Am J Psychiatry* 168:163-72.
- Andero R, Ressler KJ (2012). Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav* 11:503-12.
- Andersen SL, Rutstein M, Benzo JM, Hostetter JC, Teicher MH (1997). Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. *Neuroreport* 8:1495-8.
- Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse* 37:167-9.
- Anderson BM, Rizzo M, Block RI, Pearlson GD, O'Leary DS (2010). Sex, drugs, and cognition: effects of marijuana. *J Psychoactive Drugs* 42:413-24.
- Anker JJ, Zlebnik NE, Navin SF, Carroll ME (2011). Responding during signaled availability and nonavailability of iv cocaine and food in rats: age and sex differences. *Psychopharmacology (Berl)* 215:785-99.
- Arévalo C, De Miguel R, Hernández-Tristán R (2001). Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav* 70:123-31.
- Armario A (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:485-501.
- Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE (2002). Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ* 325:1212-3.
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396:113-6.
- Assis MA, Llorente-Berzal A, Higuera-Matas A, Coria SM, Montoya GL, Miguéns M, Viveros MP, Ambrosio E (2011). Expresión de CB2 en células inmunes en modelos de patología dual. 2ª Reunión conjunta Red de Trastornos Adictivos (RTA) - Sociedad Española de Neurociencia (SENC) – Cibersam. Salamanca (Spain), September 27-28, 2011. Book of abstracts O14, page 25.
- Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, Djiane J (2008). Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* 32:1153-60.
- Atwood BK, Mackie K (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160:467-79.

- Bale TL (2009). Neuroendocrine and immune influences on the CNS: it's a matter of sex. *Neuron* 64:13-6.
- Bambico F, Nguyen N, Katz N, Gobbi G (2010). Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiol Dis* 37:641-55.
- Battaglia G, Sharkey J, Kuhar MJ, De Souza EB (1991). Neuroanatomic specificity and time course of alterations in rat brain serotonergic pathways induced by MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): assessment using quantitative autoradiography. *Synapse* 8:249-60.
- Battaglia G, Yeh SY, De Souza EB (1988). MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 29:269-74.
- Battaglia G, Yeh SY, O'Hearn E, Molliver ME, Kuhar MJ, De Souza EB (1987). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. *J Pharmacol Exp Ther* 242:911-6.
- Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M (2012). The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 6:9.
- Bauer LO (1996). Psychomotor and electroencephalographic sequelae of cocaine dependence. *NIDA Res Monogr* 163:66-93.
- Baumann MH, Wang X, Rothman RB (2007). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology (Berl)* 189:407-24.
- Bava S, Tapert SF (2010). Adolescent brain development and the risk for alcohol and other drug problems. *Neuropsychol Rev* 20:398-413.
- Bechara A, Dolan S, Denburg N, Hindes A, Anderson SW, Nathan PE (2001). Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. *Neuropsychologia* 39:376-89.
- Becker JB (2009). Sexual differentiation of motivation: a novel mechanism? *Horm Behav* 55:646-54.
- Belin D, Deroche-Gamonet V (2012). Responses to novelty and vulnerability to cocaine addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:
- Bellinger DL, Lubahn C, Lorton D (2008). Maternal and early life stress effects on immune function: relevance to immunotoxicology. *J Immunotoxicol* 5:419-44.
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano

- G (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13:281-3.
- Beltramo M, Piomelli D (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylethanolamide. *Neuroreport* 11:1231-5.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez De Fonseca F (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav* 95:375-82.
- Bilsky EJ, Reid LD (1991). MDL72222, a serotonin 5-HT₃ receptor antagonist, blocks MDMA's ability to establish a conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 39:509-12.
- Bisicaia M, Fernandez B, Higuera-Matas A, Miguens M, Viveros MP, Garcia-Lecumberri C, Ambrosio E (2008). Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55,940 on morphine self-administration behaviour and the endogenous opioid system. *Neuropharmacology* 54:863-73.
- Bisicaia M, Marin S, Fernandez B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, Viveros MP (2003). Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 170:301-8.
- Bisogno T, Maccarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V (2001). The uptake by cells of 2-arachidonylethanolamide, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268:1982-9.
- Blazer DG, Kessler RC, McGonagle KA, Swartz MS (1994). The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. *Am J Psychiatry* 151:979-86.
- Bolla KI, McCann UD, Ricarte GA (1998). Memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users. *Neurology* 51:1532-7.
- Borcel E, Pérez-Alvarez L, De Ceballos ML, Ramirez BG, Marco EM, Fernández B, Rubio M, Guaza C, Viveros MP (2004). Functional responses to the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in neonatal rats of both genders: influence of weaning. *Pharmacol Biochem Behav* 78:593-602.
- Bos KJ, Zeanah CH, Smyke AT, Fox NA, Nelson CA (2010). Stereotypies in children with a history of early institutional care. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164:406-11.
- Bossong MG, Niesink RJ (2010). Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Prog Neurobiol* 92:370-85.
- Bouret SG, Simerly RB (2007). Development of leptin-sensitive circuits. *J Neuroendocrinol* 19:575-82.

- Boutros NN, Lisanby SH, Tokuno H, Torello MW, Campbell D, Berman R, Malison R, Krystal JH, Kosten T (2001). Elevated motor threshold in drug-free, cocaine-dependent patients assessed with transcranial magnetic stimulation. *Biol Psychiatry* 49:369-73.
- Braida D, Iosué S, Pegorini S, Sala M (2005). 3,4 Methylenedioxymethamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) is mediated by endocannabinoid system. *Pharmacol Res* 51:177-82.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008). The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760-7.
- Bredy TW, Barad M (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 15:39-45.
- Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (2007). Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14:268-76.
- Brenhouse HC, Andersen SL (2011). Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1687-703.
- Brugal MT, Pulido J, Toro C, De La Fuente L, Bravo MJ, Ballesta R, Soriano V, Barrio G, Vallejo F, Domingo-Salvany A, Castellano Y, Group PI (2009). Injecting, sexual risk behaviors and HIV infection in young cocaine and heroin users in Spain. *Eur Addict Res* 15:171-8.
- Bruijnzeel AW, Repetto M, Gold MS (2004). Neurobiological mechanisms in addictive and psychiatric disorders. *Psychiatr Clin North Am* 27:661-74.
- Bubeníková V, Votava M, Horáček J, Páleníček T (2005). Relation of sex and estrous phase to deficits in prepulse inhibition of the startle response induced by ecstasy (MDMA). *Behav Pharmacol* 16:127-30.
- Budney AJ, Hughes JR, Moore BA, Vandrey R (2004). Review of the validity and significance of cannabis withdrawal syndrome. *Am J Psychiatry* 161:1967-77.
- Burke NN, Llorente R, Marco EM, Tong K, Finn DP, Viveros MP, Roche M (2013). Maternal Deprivation Is Associated With Sex-Dependent Alterations in Nociceptive Behavior and Neuroinflammatory Mediators in the Rat Following Peripheral Nerve Injury. *J Pain*, 10.1016/j.jpain.2013.05.003
- Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, De La Torre R, Maldonado R, Ozaita A (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70:479-86.
- Büttner A, Mall G, Penning R, Sachs H, Weis S (2003). The neuropathology of cocaine abuse. *Leg Med (Tokyo)* 5 Suppl 1:S240-2.

- Cabral GA (2006). Drugs of abuse, immune modulation, and AIDS. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:280-95.
- Caillé S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH (2007). Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci* 27:3695-702.
- Campbell J, Spear LP (1999). Effects of early handling on amphetamine-induced locomotor activation and conditioned place preference in the adult rat. *Psychopharmacology (Berl)* 143:183-9.
- Carey RJ, Depalma G, Damianopoulos E (2005). Acute and chronic cocaine behavioral effects in novel versus familiar environments: open-field familiarity differentiates cocaine locomotor stimulant effects from cocaine emotional behavioral effects. *Behav Brain Res* 158:321-30.
- Castañé A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002). Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology* 43:857-67.
- Catlow BJ, Badanich KA, Sponaugle AE, Rowe AR, Song S, Rafalovich I, Sava V, Kirstein CL, Sanchez-Ramos J (2010). Effects of MDMA ("ecstasy") during adolescence on place conditioning and hippocampal neurogenesis. *Eur J Pharmacol* 628:96-103.
- Cha YM, Jones KH, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (2007). Sex differences in the effects of delta9-tetrahydrocannabinol on spatial learning in adolescent and adult rats. *Behav Pharmacol* 18:563-9.
- Cha YM, White AM, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (2006). Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83:448-55.
- Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN (2003). Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry* 160:1041-52.
- Chang L, Mehringer CM, Ernst T, Melchor R, Myers H, Forney D, Satz P (1997). Neurochemical alterations in asymptomatic abstinent cocaine users: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry* 42:1105-14.
- Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ (2005). Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 30:516-24.
- Choi DC, Rothbaum BO, Gerardi M, Ressler KJ (2010). Pharmacological enhancement of behavioral therapy: focus on posttraumatic stress disorder. *Curr Top Behav Neurosci* 2:279-99.
- Choy K, De Visser Y, Nichols N, Van Den Buuse M (2008). Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus* 18:655-67.
- Choy K, De Visser Y, Van Den Buuse M (2009). The effect of 'two hit' neonatal and young-adult stress

- on dopaminergic modulation of prepulse inhibition and dopamine receptor density. *Br J Pharmacol* 156:388-96.
- Chugani HT, Behen ME, Muzik O, Juhász C, Nagy F, Chugani DC (2001). Local brain functional activity following early deprivation: a study of postinstitutionalized Romanian orphans. *Neuroimage* 14:1290-301.
- Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ (2009). Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 33:573-85.
- Clarke JR, Rossato JI, Monteiro S, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M (2008). Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 90:374-81.
- Coffey SF, Dansky BS, Carrigan MH, Brady KT (2000). Acute and protracted cocaine abstinence in an outpatient population: a prospective study of mood, sleep and withdrawal symptoms. *Drug Alcohol Depend* 59:277-86.
- Cole JC, Sumnall HR (2003). The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev* 27:199-217.
- Connor TJ, Harkin A, Kelly JP (2005). Methylenedioxymethamphetamine suppresses production of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α independent of a beta-adrenoceptor-mediated increase in interleukin-10. *J Pharmacol Exp Ther* 312:134-43.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19:323-62.
- Corbillé AG, Valjent E, Marsicano G, Ledent C, Lutz B, Hervé D, Girault JA (2007). Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. *J Neurosci* 27:6937-47.
- Corchero J, Fuentes JA, Manzanares J (1999). Chronic treatment with CP-55,940 regulates corticotropin releasing factor and proopiomelanocortin gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Life Sci* 64:905-11.
- Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Böhme GA, Parmentier M, Fratta W (2001). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* 118:61-5.
- Cota D (2008). The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:35-8.
- Cottrell EC, Cripps RL, Duncan JS, Barrett P, Mercer JG, Herwig A, Ozanne SE (2009). Developmental

- changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R631-9.
- Craft RM, Marusich JA, Wiley JL (2013). Sex differences in cannabinoid pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life Sci* 92:476-81.
- Cravatt BF, Lichtman AH (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 61:149-60.
- Crews F, He J, Hodge C (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86:189-99.
- Crippa JA, Zuardi AW, Hallak JE (2010). [Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry]. *Rev Bras Psiquiatr* 32 Suppl 1:S56-66.
- Crombag HS, Bossert JM, Koya E, Shaham Y (2008). Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3233-43.
- Davis JF, Choi DL, Schurdak JD, Fitzgerald MF, Clegg DJ, Lipton JW, Figlewicz DP, Benoit SC (2011). Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biol Psychiatry* 69:668-74.
- Davis JF, Krause EG, Melhorn SJ, Sakai RR, Benoit SC (2009). Dominant rats are natural risk takers and display increased motivation for food reward. *Neuroscience* 162:23-30.
- Daza-Losada M, Miñarro J, Aguilar MA, Valverde O, Rodríguez-Arias M (2011). Acute blockade of CB1 receptor leads to reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 100:33-9.
- Daza-Losada M, Ribeiro Do Couto B, Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2007). Rewarding effects and reinstatement of MDMA-induced CPP in adolescent mice. *Neuropsychopharmacology* 32:1750-9.
- De Lima MN, Presti-Torres J, Vedana G, Alcalde LA, Stertz L, Fries GR, Roesler R, Andersen ML, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N (2011). Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated D-amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 224:100-6.
- De Vries TJ, Homberg JR, Binnekade R, Raasø H, Schoffelmeer AN (2003). Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168:164-9.
- De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* 7:1151-4.

- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149:470-5.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-13.
- Di Benedetto M, Bastías Candia SEC, D'addario C, Porticella EE, Cavina C, Candeletti S, Romualdi P (2011). Regulation of opioid gene expression in the rat brainstem by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): role of serotonin and involvement of CREB and ERK cascade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383:169-78.
- Di Forti M, Morrison PD, Butt A, Murray RM (2007). Cannabis use and psychiatric and cognitive disorders: the chicken or the egg? *Curr Opin Psychiatry* 20:228-34.
- Di Marzo V (2011). Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14:9-15.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771-84.
- Di Marzo V, De Petrocellis L (2010). Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr Med Chem* 17:1430-49.
- Di Marzo V, De Petrocellis L (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:3216-28.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121:149-58.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2010). Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain Cogn* 72:114-23.
- Dumont GJ, Kramers C, Sweep FC, Touw DJ, Van Hasselt JG, De Kam M, Van Gerven JM, Buitelaar JK, Verkes RJ (2009). Cannabis coadministration potentiates the effects of "ecstasy" on heart rate and temperature in humans. *Clin Pharmacol Ther* 86:160-6.
- Eggan SM, Mizoguchi Y, Stoyak SR, Lewis DA (2010). Development of cannabinoid 1 receptor protein and messenger RNA in monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 20:1164-74.
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G (2003). The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 23:7311-6.

- Ellenbroek B, De Bruin N, Van Den Kroonenburg P, Van Luijtelaar E, Cools A (2004). The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biol Psychiatry* 55:701-7.
- Ellenbroek BA, Cools AR (1995). Maternal separation reduces latent inhibition in the conditioned taste aversion paradigm. *Neuroscience research communications* 17:27-34.
- Ellenbroek BA, Cools AR (2000). The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. *Neuropsychopharmacology* 23:99-106.
- Ellenbroek BA, Cools AR (2002). Early maternal deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav* 73:177-84.
- Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ (2005). Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress* 8:247-57.
- Ellenbroek BA, Van Den Kroonenberg PT, Cools AR (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 30:251-60.
- Ellgren M, Spano SM, Hurd YL (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 32:607-15.
- EMCDDA (2012). Annual report 2012: the state of the drug problem in Europe. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- Eng LF, Ghirnikar RS (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-37.
- Enoch MA (2011). The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 214:17-31.
- Enoch MA (2012). The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence. *Curr Psychiatry Rep* 14:150-8.
- Ernst M, Romeo R, Andersen S (2009). Neurobiology of the development of motivated behaviors in adolescence: a window into a neural systems model. *Pharmacol Biochem Behav* 93:199-211.
- Ersche KD, Barnes A, Jones PS, Morein-Zamir S, Robbins TW, Bullmore ET (2011). Abnormal structure of frontostriatal brain systems is associated with aspects of impulsivity and compulsivity in cocaine dependence. *Brain* 134:2013-24.
- Ersche KD, Jones PS, Williams GB, Turton AJ, Robbins TW, Bullmore ET (2012). Abnormal brain structure implicated in stimulant drug addiction. *Science* 335:601-4.
- ESTUDES (2010). Encuesta estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias.
- Farhang B, Diaz S, Tang SL, Wagner EJ (2009). Sex differences in the cannabinoid regulation of energy

- homeostasis. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S237-46.
- Fatemi SH, Folsom TD (2009). The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 35:528-48.
- Fattore L, Fratta W (2010). How important are sex differences in cannabinoid action? *Br J Pharmacol* 160:544-8.
- Fattore L, Spano S, Cossu G, Deiana S, Fadda P, Fratta W (2005). Cannabinoid CB(1) antagonist SR 141716A attenuates reinstatement of heroin self-administration in heroin-abstinent rats. *Neuropharmacology* 48:1097-104.
- Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D (2010). Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev* 34:821-34.
- Faure J, Stein DJ, Daniels W (2009). Maternal separation fails to render animals more susceptible to methamphetamine-induced conditioned place preference. *Metab Brain Dis* 24:541-59.
- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ (2006). Cannabis use and other illicit drug use: testing the cannabis gateway hypothesis. *Addiction* 101:556-69.
- Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Nunez L, Ellenbroek BA, Rodriguez De Fonseca F (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 206:531-49.
- Fernández-Ruiz J, Gómez M, Hernández M, De Miguel R, Ramos JA (2004). Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res* 6:389-401.
- Fernández-Ruiz J, Hernández M, Ramos JA (2010). Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16:e72-91.
- Ferraz-De-Paula V, Stankevicius D, Ribeiro A, Pinheiro ML, Rodrigues-Costa EC, Florio JC, Lapachinske SF, Moreau RL, Palermo-Neto J (2011). Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. *Braz J Med Biol Res* 44:428-37.
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447:178-82.
- Flagel SB, Vázquez DM, Robinson TE (2003). Manipulations during the second, but not the first, week of life increase susceptibility to cocaine self-administration in female rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1741-51.
- Flor-Henry P (1985). Schizophrenia: sex differences. *Can J Psychiatry* 30:319-22.

- Fonsart J, Menet MC, Debray M, Hirt D, Noble F, Scherrmann JM, Declèves X (2009). Sprague-Dawley rats display sex-linked differences in the pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA). *Toxicol Appl Pharmacol* 241:339-47.
- Forget B, Hamon M, Thiébot MH (2005). Cannabinoid CB1 receptors are involved in motivational effects of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 181:722-34.
- Fowler CJ (2012). Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol Sci* 33:181-5.
- Fox HC, D'sa C, Kimmerling A, Siedlarz KM, Tuit KL, Stowe R, Sinha R (2012). Immune system inflammation in cocaine dependent individuals: implications for medications development. *Hum Psychopharmacol* 27:156-66.
- Frau L, Simola N, Plumitallo A, Morelli M (2013). Microglial and astroglial activation by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice depends on S(+) enantiomer and is associated with an increase in body temperature and motility. *J Neurochem* 124:69-78.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-66.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 15:64-9.
- Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS (2006). Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51:811-22.
- Gaffuri AL, Ladarre D, Lenkei Z (2012). Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development. *Pharmacology* 90:19-39.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzmán M (2006). Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr Pharm Des* 12:2319-25.
- Galve-Roperh I, Palazuelos J, Aguado T, Guzmán M (2009). The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259:371-82.
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang MY, Strassle BW, Lu P, Mark L, Piesla MJ, Deng K, Kouranova EV, Ring RH, Whiteside GT, Bates B, Walsh FS, Williams G, Pangalos MN, Samad TA, Doherty P (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30:2017-24.
- Garey L (2010). When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J Anat* 217:324-33.

- Garner B, Wood SJ, Pantelis C, Van Den Buuse M (2007). Early maternal deprivation reduces prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: no further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment. *Behav Brain Res* 176:323-32.
- Gerra G, Bassignana S, Zaimovic A, Moi G, Bussandri M, Caccavari R, Brambilla F, Molina E (2003). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in subjects with 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ('ecstasy') use history: correlation with dopamine receptor sensitivity. *Psychiatry Res* 120:115-24.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156:117-54.
- Giuffrida A, Seillier A (2012). New insights on endocannabinoid transmission in psychomotor disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38:51-8.
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988). Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 8:2485-90.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8174-9.
- Goldstein RZ, Craig AD, Bechara A, Garavan H, Childress AR, Paulus MP, Volkow ND (2009). The neurocircuitry of impaired insight in drug addiction. *Trends Cogn Sci* 13:372-80.
- González S, Cascio MG, Fernández-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002a). Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* 954:73-81.
- Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Sparpaglione V, Parolaro D, Ramos JA (2002). Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB(1) receptor binding and mRNA levels. *Drug Alcohol Depend* 66:77-84.
- Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ (2008). Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1152-60.
- Gould E (1994). The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann N Y Acad Sci* 743:73-92; discussion 92-3.
- Gourley SL, Kedves AT, Olausson P, Taylor JR (2009). A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology* 34:707-16.
- Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2009). Neurotoxicity of drugs of abuse--the case of methylenedioxyamphetamines (MDMA, ecstasy), and amphetamines. *Dialogues Clin Neurosci* 11:305-

17.

Graham BM, Milad MR (2011). The study of fear extinction: implications for anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 168:1255-65.

Graham DL, Herring NR, Schaefer TL, Vorhees CV, Williams MT (2010). Glucose and corticosterone changes in developing and adult rats following exposure to (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine or 5-methoxydiisopropyltryptamine. *Neurotoxicol Teratol* 32:152-7.

Graham FK (1975). Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 12:238-48.

Gray J (1987). The psychology of fear and stress. Problems in the behavioural sciences. CU Press. Cambridge

Gray JA, Buffery AW (1971). Sex differences in emotional and cognitive behaviour in mammals including man: adaptive and neural bases. *Acta Psychol (Amst)* 35:89-111.

Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wörtwein G (2005). Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res* 79:772-8.

Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8:65-72.

Grov C, Kelly BC, Parsons JT (2009). Polydrug use among club-going young adults recruited through time-space sampling. *Subst Use Misuse* 44:848-64.

Gruss M, Braun K, Frey JU, Korz V (2008). Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats. *Neuroscience* 152:1-7.

Guastella AJ, Richardson R, Lovibond PF, Rapee RM, Gaston JE, Mitchell P, Dadds MR (2008). A randomized controlled trial of D-cycloserine enhancement of exposure therapy for social anxiety disorder. *Biol Psychiatry* 63:544-9.

Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci* 20:441-58.

Gunduz-Cinar O, Macpherson KP, Cinar R, Gamble-George J, Sugden K, Williams B, Godlewski G, Ramikie TS, Gorka AX, Alapafuja SO, Nikas SP, Makriyannis A, Poulton R, Patel S, Hariri AR, Caspi A, Moffitt TE, Kunos G, Holmes A (2013). Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol Psychiatry* 18:813-23.

- Gurtman CG, Morley KC, Li KM, Hunt GE, McGregor IS (2002). Increased anxiety in rats after 3,4-methylenedioxymethamphetamine: association with serotonin depletion. *Eur J Pharmacol* 446:89-96.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Haj-Dahmane S, Shen RY (2011). Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* 61:414-20.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF (2004). CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol* 15:299-304.
- Handa RJ, Pak TR, Kudwa AE, Lund TD, Hinds L (2008). An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Horm Behav* 53:741-52.
- Hansson SR, Cabrera-Vera TM, Hoffman BJ (1998). Infraorbital nerve transection alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat development. *Brain Res Dev Brain Res* 111:305-14.
- Hariri AR, Gorka A, Hyde LW, Kimak M, Halder I, Ducci F, Ferrell RE, Goldman D, Manuck SB (2009). Divergent effects of genetic variation in endocannabinoid signaling on human threat- and reward-related brain function. *Biol Psychiatry* 66:9-16.
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 28:83-92.
- Harkany T, Mackie K, Doherty P (2008). Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol* 18:338-45.
- Harrison PJ (1995). On the neuropathology of schizophrenia and its dementia: neurodevelopmental, neurodegenerative, or both? *Neurodegeneration* 4:1-12.
- Harrison PJ (1997). Schizophrenia: a disorder of neurodevelopment? *Curr Opin Neurobiol* 7:285-9.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007). Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* 27:1211-9.
- Heitland I, Klumpers F, Oosting RS, Evers DJ, Leon Kenemans J, Baas JM (2012). Failure to extinguish fear and genetic variability in the human cannabinoid receptor 1. *Transl Psychiatry* 2:e162.
- Heldt SA, Mou L, Ressler KJ (2012). In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear

- extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. *Transl Psychiatry* 2:e181.
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12:656-70.
- Henquet C, Krabbendam L, Spauwen J, Kaplan C, Lieb R, Wittchen HU, Van Os J (2005). Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *BMJ* 330:11.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932-6.
- Herning RI, King DE, Better WE, Cadet JL (1999). Neurovascular deficits in cocaine abusers. *Neuropsychopharmacology* 21:110-8.
- Hetrick SE, Purcell R, Garner B, Parslow R (2010). Combined pharmacotherapy and psychological therapies for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev*, 10.1002/14651858.CD007316.pub2CD007316.
- Higuchi S, Irie K, Mishima S, Araki M, Ohji M, Shirakawa A, Akitake Y, Matsuyama K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2010). The cannabinoid 1-receptor silent antagonist O-2050 attenuates preference for high-fat diet and activated astrocytes in mice. *J Pharmacol Sci* 112:369-72.
- Higuera-Matas A, Botreau F, Miguéns M, Del Olmo N, Borcel E, Pérez-Alvarez L, García-Lecumberri C, Ambrosio E (2009). Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 93:482-90.
- Hill MN, Gorzalka BB (2006). Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. *Psychoneuroendocrinology* 31:526-36.
- Hill MN, McEwen BS (2010). Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:791-7.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Viau V (2010). Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9406-11.
- Hillard CJ, Weinlander KM, Stuhr KL (2012). Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience* 204:207-29.
- Hittner JB, Swickert R (2006). Sensation seeking and alcohol use: a meta-analytic review. *Addict Behav* 31:1383-401.
- Hofmann SG, Meuret AE, Smits JA, Simon NM, Pollack MH, Eisenmenger K, Shiekh M, Otto MW

- (2006). Augmentation of exposure therapy with D-cycloserine for social anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry* 63:298-304.
- Hofmann SG, Smits JA (2008). Cognitive-behavioral therapy for adult anxiety disorders: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *J Clin Psychiatry* 69:621-32.
- Hölter SM, Kallnik M, Wurst W, Marsicano G, Lutz B, Wotjak CT (2005). Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. *Eur J Pharmacol* 510:69-74.
- Houchi H, Babovic D, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M, Naassila M (2005). CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology* 30:339-49.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:345-58.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29:307-13.
- Husum H, Termeer E, Mathé AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA (2002). Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42:798-806.
- Hyman SE (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162:1414-22.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-98.
- Janiri L, Martinotti G, Dario T, Reina D, Paparello F, Pozzi G, Addolorato G, Di Giannantonio M, De Risio S (2005). Anhedonia and substance-related symptoms in detoxified substance-dependent subjects: a correlation study. *Neuropsychobiology* 52:37-44.
- Johnston AL, File SE (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 49:245-50.
- Justinova Z, Munzar P, Panlilio LV, Yasar S, Redhi GH, Tanda G, Goldberg SR (2008). Blockade of THC-seeking behavior and relapse in monkeys by the cannabinoid CB(1)-receptor antagonist rimonabant. *Neuropsychopharmacology* 33:2870-7.
- Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG (2001). Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 157:305-12.
- Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG (2002). Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization

- and tolerance. *Neuropsychopharmacology* 27:518-33.
- Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG (2003). Long-lasting changes in morphine-induced locomotor sensitization and tolerance in Long-Evans mother rats as a result of periodic postpartum separation from the litter: a novel model of increased vulnerability to drug abuse? *Neuropsychopharmacology* 28:317-28.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162:1403-13.
- Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, Lutz B, Wotjak CT (2006). Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J Neurosci* 26:6677-86.
- Kamprath K, Plendl W, Marsicano G, Deussing JM, Wurst W, Lutz B, Wotjak CT (2009). Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. *Genes Brain Behav* 8:203-11.
- Kaplan GB, Heinrichs SC, Carey RJ (2011). Treatment of addiction and anxiety using extinction approaches: neural mechanisms and their treatment implications. *Pharmacol Biochem Behav* 97:619-25.
- Karlsen SN, Spigset O, Slørdal L (2008). The dark side of ecstasy: neuropsychiatric symptoms after exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:15-24.
- Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleshkaya N, Agústsðóttir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R, Drew LJ, Castrén E (2011). Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* 334:1731-4.
- Kathmann M, Bauer U, Schlicker E, Göthert M (1999). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359:466-70.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9:76-81.
- Katona I, Freund TF (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14:923-30.
- Keimpema E, Mackie K, Harkany T (2011). Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci* 32:551-61.
- Kelly BC, Parsons JT, Wells BE (2006). Prevalence and predictors of club drug use among club-going young adults in New York city. *J Urban Health* 83:884-95.

- Kendler K, Sheth K, Gardner C, Prescott C (2002). Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychol Med* 32:1187-94.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (2005a). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62:593-602.
- Kessler RC, Demler O, Frank RG, Olfson M, Pincus HA, Walters EE, Wang P, Wells KB, Zaslavsky AM (2005b). Prevalence and treatment of mental disorders, 1990 to 2003. *N Engl J Med* 352:2515-23.
- Kim J, Alger BE (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* 7:697-8.
- Kinsey SG, O'Neal ST, Long JZ, Cravatt BF, Lichtman AH (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behav* 98:21-7.
- Klein C, Karanges E, Spiro A, Wong A, Spencer J, Huynh T, Gunasekaran N, Karl T, Long LE, Huang XF, Liu K, Arnold JC, McGregor IS (2011). Cannabidiol potentiates Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 218:443-57.
- Kobeissy FH, Jeung JA, Warren MW, Geier JE, Gold MS (2008). Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addict Biol* 13:15-25.
- Koenig J, Lazarus C, Jeltsch H, Ben Hamida S, Riegert C, Kelche C, Jones BC, Cassel JC (2005). MDMA (ecstasy) effects in pubescent rats: Males are more sensitive than females. *Pharmacol Biochem Behav* 81:635-44.
- Kokras N, Dalla C, Sideris AC, Dendi A, Mikail HG, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z (2012). Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. *Neuropharmacology* 62:436-45.
- Kolyaduke OV, Hughes RN (2013). Increased anxiety-related behavior in male and female adult rats following early and late adolescent exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Pharmacol Biochem Behav* 103:742-9.
- Koob GF, Volkow ND (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217-38.
- Korb E, Finkbeiner S (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* 34:591-8.
- Korosi A, Naninck EF, Oomen CA, Schouten M, Krugers H, Fitzsimons C, Lucassen PJ (2012). Early-

- life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Behav Brain Res* 227:400-9.
- Kosten TA, Zhang XY, Kehoe P (2004). Infant rats with chronic neonatal isolation experience show decreased extracellular serotonin levels in ventral striatum at baseline and in response to cocaine. *Brain Res Dev Brain Res* 152:19-24.
- Krebs-Thomson K, Giracello D, Solis A, Geyer MA (2001). Post-weaning handling attenuates isolation-rearing induced disruptions of prepulse inhibition in rats. *Behav Brain Res* 120:221-4.
- Kreek MJ, Levran O, Reed B, Schlussman SD, Zhou Y, Butelman ER (2012). Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *J Clin Invest* 122:3387-93.
- Kumari V, Aasen I, Sharma T (2004). Sex differences in prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 69:219-35.
- Kushner MG, Kim SW, Donahue C, Thuras P, Adson D, Kotlyar M, McCabe J, Peterson J, Foa EB (2007). D-cycloserine augmented exposure therapy for obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 62:835-8.
- Lafenêtre P, Chaouloff F, Marsicano G (2009). Bidirectional regulation of novelty-induced behavioral inhibition by the endocannabinoid system. *Neuropharmacology* 57:715-21.
- Lamota L, Bermudez-Silva FJ, Marco EM, Llorente R, Gallego A, Rodríguez De Fonseca F, Viveros MP (2008). Effects of adolescent nicotine and SR 147778 (Surinabant) administration on food intake, somatic growth and metabolic parameters in rats. *Neuropharmacology* 54:194-205.
- Lattal KM, Barrett RM, Wood MA (2007). Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci* 121:1125-31.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2699-704.
- Laviola G, Marco EM (2011). Passing the knife edge in adolescence: brain pruning and specification of individual lines of development. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1631-3.
- Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis R, Spear LP (1995). Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 275:345-57.
- Lawston J, Borella A, Robinson JK, Whitaker-Azmitia PM (2000). Changes in hippocampal morphology following chronic treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Brain Res* 877:407-10.
- Le Foll B, Goldberg SR (2004). Rimonabant, a CB1 antagonist, blocks nicotine-conditioned place preferences. *Neuroreport* 15:2139-43.
- Lebesgue D, Chevalleyre V, Zukin RS, Etgen AM (2009). Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74:555-61.

- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (1999). Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav Brain Res* 104:113-7.
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (2000). Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 41:365-71.
- Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR (2002). Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:141-5.
- Leventhal AM, Brightman M, Ameringer KJ, Greenberg J, Mickens L, Ray LA, Sun P, Sussman S (2010). Anhedonia associated with stimulant use and dependence in a population-based sample of American adults. *Exp Clin Psychopharmacol* 18:562-9.
- Levine S (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 73:255-60.
- Leweke FM, Koethe D (2008). Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol* 13:264-75.
- Li L, Du Y, Li N, Wu X, Wu Y (2009). Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1157-67.
- Li Y, Robinson TE, Bhatnagar S (2003). Effects of maternal separation on behavioural sensitization produced by repeated cocaine administration in adulthood. *Brain Res* 960:42-7.
- Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 119:282-90.
- Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Rakic P (1991). Synchronized overproduction of neurotransmitter receptors in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10218-21.
- Lieb R, Schuetz CG, Pfister H, Von Sydow K, Wittchen H (2002). Mental disorders in ecstasy users: a prospective-longitudinal investigation. *Drug Alcohol Depend* 68:195-207.
- Liechti ME, Gamma A, Vollenweider FX (2001). Gender differences in the subjective effects of MDMA. *Psychopharmacology (Berl)* 154:161-8.
- Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25:3091-8.
- Lizasoain I, Moro MA (2012). Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones* 14:57-65.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP (2007). Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32(6):636-50.

- Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2009). Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci* 27:233-41.
- Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, Marco EM, Guaza C, Prada C, López-Gallardo M, Di Marzo V, Viveros MP (2008). Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Dev Neurobiol* 68:1334-47.
- Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, Ramirez MJ, De Kloet ER, Viveros MP (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J Neuroendocrinol* 23:329-44.
- Llorente R, Villa P, Marco EM, Viveros MP (2012). Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience* 201:12-9.
- Llorente-Berzal A, Mela V, Borcel E, Valero M, López-Gallardo M, Viveros MP, Marco EM (2012). Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. *Neuropharmacology* 62:1332-41.
- Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Lundgren P, Bäckström T (2006). Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav* 50:208-15.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavón FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5:37-44.
- Lopez-Gallardo M, Llorente R, Llorente-Berzal A, Marco EM, Prada C, Di Marzo V, Viveros MP (2008). Neuronal and glial alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Dev Neurobiol* 68:1429-40.
- López-Moreno JA, Echeverry-Alzate V, Bühler KM (2012). The genetic basis of the endocannabinoid system and drug addiction in humans. *J Psychopharmacol* 26:133-43.
- López-Moreno JA, González-Cuevas G, Rodríguez De Fonseca F, Navarro M (2004). Long-lasting increase of alcohol relapse by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 during alcohol deprivation. *J Neurosci* 24:8245-52.
- Luchicchi A, Lecca S, Carta S, Pillolla G, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, Pistis M (2010). Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR-alpha nuclear receptors. *Addict Biol* 15:277-88.

- Luchicchi A, Pistis M (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Mol Neurobiol* 46:374-92.
- Lyon L, Saksida LM, Bussey TJ (2012). Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: a review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models. *Psychopharmacology (Berl)* 220:647-72.
- Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, Gasperi V, Prosperetti C, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Cravatt BF, Centonze D (2008). Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* 11:152-9.
- Mackie K (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*, 299-325.
- MacLusky NJ, Naftolin F (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211:1294-302.
- Macri S, Laviola G (2004). Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behav Brain Res* 154:231-8.
- Macri S, Mason GJ, Wurbel H (2004). Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur J Neurosci* 20:1017-24.
- Maddox SA, Schafe GE (2011). Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. *Learn Mem* 18:579-93.
- Mahan AL, Ressler KJ (2012). Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends Neurosci* 35:24-35.
- Maione S, Costa B, Piscitelli F, Morera E, De Chiaro M, Comelli F, Boccella S, Guida F, Verde R, Ortar G, Di Marzo V (2013). Piperazinyl carbamate fatty acid amide hydrolase inhibitors and transient receptor potential channel modulators as "dual-target" analgesics. *Pharmacol Res* 76C:98-105.
- Malberg JE, Seiden LS (1998). Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci* 18:5086-94.
- Maldonado AM, Kirstein CL (2005). Handling alters cocaine-induced activity in adolescent but not adult male rats. *Physiol Behav* 84:321-6.
- Malone DT, Taylor DA (2006). The effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on sensorimotor gating in socially isolated rats. *Behav Brain Res* 166:101-9.
- Malvaez M, Sanchis-Segura C, Vo D, Lattal KM, Wood MA (2010). Modulation of chromatin

- modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biol Psychiatry* 67:36-43.
- Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Daza-Losada M, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J (2010). Effect of the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 on the acquisition and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in mice. *Behav Brain Funct* 6:19.
- Marchalant Y, Rosi S, Wenk GL (2007). Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation. *Neuroscience* 144:1516-22.
- Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros M (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 33:498-507.
- Marco EM, Granstrem O, Moreno E, Llorente R, Adriani W, Laviola G, Viveros MP (2007). Subchronic nicotine exposure in adolescence induces long-term effects on hippocampal and striatal cannabinoid-CB1 and mu-opioid receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 557:37-43.
- Marco EM, Romero-Zerbo SY, Viveros MP, Bermudez-Silva FJ (2012). The role of the endocannabinoid system in eating disorders: pharmacological implications. *Behav Pharmacol* 23:526-36.
- Marco EM, Valero M, De La Serna O, Aisa B, Borcel E, Ramirez MJ, Viveros MP (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology* 68:223-31.
- Marco EM, Viveros M (2009). The critical role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis: avoiding excess and deficiencies. *Mini Rev Med Chem* 9:1407-15.
- Maren S, Phan KL, Liberzon I (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 14:417-28.
- Marriott AL, Ryan CL, Doucette TA (2012). Neonatal domoic acid treatment produces alterations to prepulse inhibition and latent inhibition in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 103:338-44.
- Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F, Zieglgänsberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 27:832-9.
- Marsicano G, Chaouloff F (2012). Moving bliss: a new anandamide transporter. *Nat Neurosci* 15:5-6.
- Marsicano G, Lutz B (2006). Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29:27-46.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002). The endogenous cannabinoid system controls

- extinction of aversive memories. *Nature* 418:530-4.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci* 12:4038-46.
- Martini M, Valverde O (2012). A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology (Berl)* 219:149-58.
- Martins SS, Ghandour LA, Chilcoat HD (2007). Pathways between ecstasy initiation and other drug use. *Addict Behav* 32:1511-8.
- Massi P, Valenti M, Bolognini D, Parolaro D (2008). Expression and function of the endocannabinoid system in glial cells. *Curr Pharm Des* 14:2289-98.
- Mateos B, Borcel E, Loriga R, Luesu W, Bini V, Llorente R, Castelli MP, Viveros MP (2011). Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB(1) cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol* 25:1676-90.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-4.
- Matthews K, Robbins TW, Everitt BJ, Caine SB (1999). Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine self-administration in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 141:123-34.
- Maynard T, Sikich L, Lieberman J, Lamantia A (2001). Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 27:457-76.
- McClelland S, Korosi A, Cope J, Ivy A, Baram TZ (2011). Emerging roles of epigenetic mechanisms in the enduring effects of early-life stress and experience on learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96:79-88.
- McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P (2010). Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn* 72:73-85.
- McEwen BS (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.
- McGrath JJ, Susser ES (2009). New directions in the epidemiology of schizophrenia. *Med J Aust* 190:S7-9.
- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G (1996). Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53:657-64.
- McKinney MK, Cravatt BF (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev*

- Biochem 74:411-32.
- McNally RJ (2007). Mechanisms of exposure therapy: how neuroscience can improve psychological treatments for anxiety disorders. *Clin Psychol Rev* 27:750-9.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturst* 25:175-213.
- Mechoulam R, Lichtman AH (2003). Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science* 302:65-7.
- Mechoulam R, Parker LA (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol* 64:21-47.
- Meier MH, Caspi A, Ambler A, Harrington H, Houts R, Keefe RS, McDonald K, Ward A, Poulton R, Moffitt TE (2012). Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2657-64.
- Mela V, Díaz F, Gertler A, Solomon G, Argente J, Viveros MP, Chowen JA (2012b). Neonatal treatment with a pegylated leptin antagonist has a sexually dimorphic effect on hypothalamic trophic factors and neuropeptide levels. *J Neuroendocrinol* 24:756-65.
- Mela V, Llorente-Berzal Á, Díaz F, Argente J, Viveros MP, Chowen JA (2012a). Maternal deprivation exacerbates the response to a high fat diet in a sexually dimorphic manner. *PLoS One* 7:e48915.
- Metna-Laurent M, Soria-Gómez E, Verrier D, Conforzi M, Jégo P, Lafenêtre P, Marsicano G (2012). Bimodal control of fear-coping strategies by CB1 cannabinoid receptors. *J Neurosci* 32:7109-18.
- Meyer G, Ferres-Torres R, Mas M (1978). The effects of puberty and castration on hippocampal dendritic spines of mice. A Golgi study. *Brain Res* 155:108-12.
- Meyer JS, Piper BJ, Vancollie VE (2008). Development and characterization of a novel animal model of intermittent MDMA ("Ecstasy") exposure during adolescence. *Ann N Y Acad Sci* 1139:151-63.
- Meyer U, Feldon J (2010). Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol* 90:285-326.
- Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F (2013). Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther* 138:18-37.
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther* 120:102-28.
- Miñarro J (2012). Cocaína. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Sumario* 32. Junio 2012.

- Mitsushima D, Yamada K, Takase K, Funabashi T, Kimura F (2006). Sex differences in the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. *Eur J Neurosci* 24:3245-54.
- Moffett MC, Harley J, Francis D, Sanghani SP, Davis WI, Kuhar MJ (2006). Maternal separation and handling affects cocaine self-administration in both the treated pups as adults and the dams. *J Pharmacol Exp Ther* 317:1210-8.
- Mohamed WM, Ben Hamida S, Cassel JC, De Vasconcelos AP, Jones BC (2011). MDMA: interactions with other psychoactive drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 99:759-74.
- Monks TJ, Jones DC, Bai F, Lau SS (2004). The role of metabolism in 3,4-(+)-methylenedioxymphetamine and 3,4-(+)-methylenedioxymphetamine (ecstasy) toxicity. *Ther Drug Monit* 26:132-6.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Düring M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51:455-66.
- Montgomery C, Fisk JE, Newcombe R (2005). The nature of ecstasy-group related deficits in associative learning. *Psychopharmacology (Berl)* 180:141-9.
- Montoya AG, Sorrentino R, Lukas SE, Price BH (2002). Long-term neuropsychiatric consequences of "ecstasy" (MDMA): a review. *Harv Rev Psychiatry* 10:212-20.
- Montoya ID, Haertzen C, Hess JM, Covi L, Fudala PJ, Johnson RE, Gorelick DA (1995). Comparison of psychological symptoms between drug abusers seeking and not seeking treatment. *J Nerv Ment Dis* 183:50-3.
- Moreira FA, Aguiar DC, Terzian AL, Guimarães FS, Wotjak CT (2012). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience* 204:186-92.
- Moreira FA, Lutz B (2008). The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13:196-212.
- Moreira FA, Wotjak CT (2010). Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2:429-50.
- Morgan C, Fisher H (2007). Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma--a critical review. *Schizophr Bull* 33:3-10.
- Morgan MJ (2000). Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology (Berl)* 152:230-48.

- Morley KC, Gallate JE, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS (2001). Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Eur J Pharmacol* 433:91-9.
- Morley KC, Li KM, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS (2004). Cannabinoids prevent the acute hyperthermia and partially protect against the 5-HT depleting effects of MDMA ("Ecstasy") in rats. *Neuropharmacology* 46:954-65.
- Muccioli GG (2010). Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today* 15:474-83.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-5.
- Myers KM, Carlezon WA, Davis M (2011). Glutamate receptors in extinction and extinction-based therapies for psychiatric illness. *Neuropsychopharmacology* 36:274-93.
- Myers KM, Davis M (2007). Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12:120-50.
- Nader K (2003). Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26:65-72.
- Nagahara AH, Tuszynski MH (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10:209-19.
- Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH (2007). Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)* 192:61-70.
- Narita M, Suzuki M, Kuzumaki N, Miyatake M, Suzuki T (2008). Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: differences between methamphetamine and morphine. *Ann N Y Acad Sci* 1141:96-104.
- Nash JF, Meltzer HY, Gudelsky GA (1988). Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 245:873-9.
- Navarrete M, Araque A (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57:883-93.
- Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, Del Arco I, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez De Fonseca F (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci* 21:5344-50.
- Nawata Y, Hiranita T, Yamamoto T (2010). A cannabinoid CB(1) receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology* 35:515-20.

- Neisewander JL, Peartree NA, Pentkowski NS (2012). Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction. *Psychopharmacology (Berl)* 224:33-56.
- Nelson CA, Zeanah CH, Fox NA, Marshall PJ, Smyke AT, Guthrie D (2007). Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project. *Science* 318:1937-40.
- Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN, Leyton M, Mzengeza S, De Montigny C, Blier P, Diksic M (1997). Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5308-13.
- Nixon K, McClain JA (2010). Adolescence as a critical window for developing an alcohol use disorder: current findings in neuroscience. *Curr Opin Psychiatry* 23:227-32.
- Niyuhire F, Varvel SA, Thorpe AJ, Stokes RJ, Wiley JL, Lichtman AH (2007). The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. *Psychopharmacology (Berl)* 191:223-31.
- Nnadi CU, Mimiko OA, McCurtis HL, Cadet JL (2005). Neuropsychiatric effects of cocaine use disorders. *J Natl Med Assoc* 97:1504-15.
- Nunes EV, Levin FR (2004). Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: a meta-analysis. *JAMA* 291:1887-96.
- Nunes EV, Sullivan MA, Levin FR (2004). Treatment of depression in patients with opiate dependence. *Biol Psychiatry* 56:793-802.
- Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53:208-13.
- Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005). CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 136:811-22.
- O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R (1993). Developing treatments that address classical conditioning. *NIDA Res Monogr* 135:71-91.
- Okamoto Y, Tsuboi K, Ueda N (2009). Enzymatic formation of anandamide. *Vitam Horm* 81:1-24.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Chirwa SS, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfitz L, Arinami T, Uhl GR (2008). Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. *Ann N Y Acad Sci* 1139:434-49.

- Orio L, O'Shea E, Sanchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, Moro MA, Green AR, Colado MI (2004). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem* 89:1445-53.
- Ortiz J, Artigas F, Gelpí E (1988). Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 43:983-90.
- O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE (2006). Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20:611-21.
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE (2004). Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18:502-8.
- Otto MW, Smits JA, Reese HE (2004). Cognitive-behavioral therapy for the treatment of anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 5:34-41.
- Otto MW, Tolin DF, Simon NM, Pearlson GD, Basden S, Meunier SA, Hofmann SG, Eisenmenger K, Krystal JH, Pollack MH (2010). Efficacy of d-cycloserine for enhancing response to cognitive-behavior therapy for panic disorder. *Biol Psychiatry* 67:365-70.
- Pacher P, Mechoulam R (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res* 50:193-211.
- Palenicek T, Votava M, Bubenikova V, Horacek J (2005). Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol Behav* 86:546-53.
- Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 188:641-9.
- Pan B, Wang W, Zhong P, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS (2011). Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 31:13420-30.
- Pardini M, Krueger F, Koenigs M, Raymont V, Hodgkinson C, Zoubak S, Goldman D, Grafman J (2012). Fatty-acid amide hydrolase polymorphisms and post-traumatic stress disorder after penetrating brain injury. *Transl Psychiatry* 2:e75.
- Pardo CA, Eberhart CG (2007). The neurobiology of autism. *Brain Pathol* 17:434-47.
- Parolaro D, Rubino T (2008). The role of the endogenous cannabinoid system in drug addiction. *Drug News Perspect* 21:149-57.

- Parrott AC (2004). MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) or ecstasy: the neuropsychobiological implications of taking it at dances and raves. *Neuropsychobiology* 50:329-35.
- Parrott AC, Lees A, Garnham NJ, Jones M, Wesnes K (1998). Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. *J Psychopharmacol* 12:79-83.
- Parrott AC, Milani RM, Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2007). Cannabis and Ecstasy/MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): an analysis of their neuropsychobiological interactions in recreational users. *J Neural Transm* 114:959-68.
- Patel S, Rademacher DJ, Hillard CJ (2003). Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 306:880-8.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005). Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21:1057-69.
- Paulus MP (2007). Neural basis of reward and craving--a homeostatic point of view. *Dialogues Clin Neurosci* 9:379-87.
- Paus T (2005). Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. *Trends Cogn Sci* 9:60-8.
- Pellow S, File SE (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525-9.
- Pertwee RG (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 152:984-6.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 62:588-631.
- Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ (2010). Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 328:1288-90.
- Pickens CL, Airavaara M, Theberge F, Fanous S, Hope BT, Shaham Y (2011). Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends Neurosci* 34:411-20.
- Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-84.
- Piper BJ (2007). A developmental comparison of the neurobehavioral effects of ecstasy (MDMA). *Neurotoxicol Teratol* 29:288-300.
- Piper BJ, Fraiman JB, Meyer JS (2005). Repeated MDMA ("Ecstasy") exposure in adolescent male rats alters temperature regulation, spontaneous motor activity, attention, and serotonin transporter binding.

- Dev Psychobiol 47:145-57.
- Piper BJ, Meyer JS (2004). Memory deficit and reduced anxiety in young adult rats given repeated intermittent MDMA treatment during the periadolescent period. *Pharmacol Biochem Behav* 79:723-31.
- Piper BJ, Meyer JS (2006). Increased responsiveness to MDMA in adult rats treated neonatally with MDMA. *Neurotoxicol Teratol* 28:95-102.
- Pistis M, Melis M (2010). From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem* 17:1450-67.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (2004). Adolescent exposure to cannabinoids induces long-lasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry* 56:86-94.
- Planeta CS, Marin MT (2002). Effect of cocaine on periadolescent rats with or without early maternal separation. *Braz J Med Biol Res* 35:1367-71.
- Plendl W, Wotjak CT (2010). Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. *J Neurosci* 30:4990-8.
- Pope HG, Gruber AJ, Hudson JI, Cohane G, Huestis MA, Yurgelun-Todd D (2003). Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? *Drug Alcohol Depend* 69:303-10.
- Prakash A, Das G (1993). Cocaine and the nervous system. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 31:575-81.
- Quinn H, Matsumoto I, Callaghan P, Long L, Arnold J, Gunasekaran N, Thompson M, Dawson B, Mallet P, Kashem M, Matsuda-Matsumoto H, Iwazaki T, McGregor I (2008). Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33:1113-26.
- Rao Y, Mineur YS, Gan G, Wang AH, Liu ZW, Wu X, Suyama S, De Lecea L, Horvath TL, Picciotto MR, Gao XB (2013). Repeated in vivo exposure of cocaine induces long-lasting synaptic plasticity in hypocretin/orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus in mice. *J Physiol* 591:1951-66.
- Reich CG, Taylor ME, McCarthy MM (2009). Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. *Behav Brain Res* 203:264-9.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Fotopoulos A, Alboycharali J, Konstandi M (2010). Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neurosci Lett* 480:7-11.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Syrrou M, Papadopoulou-Daifoti Z, Konstandi M (2013). Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav Brain Res* 244:29-37.

- Ressler KJ, Rothbaum BO, Tannenbaum L, Anderson P, Graap K, Zimand E, Hodges L, Davis M (2004). Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Arch Gen Psychiatry* 61:1136-44.
- Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J (2011). Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res* 36:460-6.
- Rey AA, Purrio M, Viveros MP, Lutz B (2012). Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 37:2624-34.
- Riebe CJ, Pamplona FA, Pamplona F, Kamprath K, Wotjak CT (2012). Fear relief-toward a new conceptual frame work and what endocannabinoids gotta do with it. *Neuroscience* 204:159-85.
- Riebe CJ, Wotjak CT (2011). Endocannabinoids and stress. *Stress* 14:384-97.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G (2006). Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci* 9:1526-33.
- Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA (2004). Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* 55:708-14.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7:609-16.
- Rodríguez De Fonseca F, Ramos J, Bonnin A, Fernández-Ruiz J (1993). Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4:135-8.
- Rodsiri R, Spicer C, Green AR, Marsden CA, Fone KC (2011). Acute concomitant effects of MDMA binge dosing on extracellular 5-HT, locomotion and body temperature and the long-term effect on novel object discrimination in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 213:365-76.
- Romeo R (2003). Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 15:1185-92.
- Romero EM, Fernández B, Sagredo O, Gomez N, Urigüen L, Guaza C, De Miguel R, Ramos JA, Viveros MP (2002). Antinociceptive, behavioural and neuroendocrine effects of CP 55,940 in young rats. *Brain Res Dev Brain Res* 136:85-92.
- Romero J, Berrendero F, Manzanares J, Pérez A, Corchero J, Fuentes JA, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA (1998). Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. *Synapse* 30:298-308.

- Rosa ML, Silva RC, Moura-De-Carvalho FT, Brandão ML, Guimarães FS, Del Bel EA (2005). Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. *Braz J Med Biol Res* 38:1691-6.
- Ross S, Peselow E (2009). The neurobiology of addictive disorders. *Clin Neuropharmacol* 32:269-76.
- Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D (2004). Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol Cell Neurosci* 25:355-62.
- Rubino T, Parolaro D (2011). Sexually dimorphic effects of cannabinoid compounds on emotion and cognition. *Front Behav Neurosci* 5:64.
- Rubino T, Realini N, Braida D, Guidi S, Capurro V, Viganò D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartsaghi R, Parolaro D (2009). Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19:763-72.
- Ruehle S, Rey AA, Remmers F, Lutz B (2012). The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol* 26:23-39.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092-101.
- SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) (2011). Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings. SAMHSA. Rockville, MD (USA)
- Sandi C, Bisaz R (2007). A model for the involvement of neural cell adhesion molecules in stress-related mood disorders. *Neuroendocrinology* 85:158-76.
- Santa Ana EJ, Rounsaville BJ, Frankforter TL, Nich C, Babuscio T, Poling J, Gonsai K, Hill KP, Carroll KM (2009). D-Cycloserine attenuates reactivity to smoking cues in nicotine dependent smokers: a pilot investigation. *Drug Alcohol Depend* 104:220-7.
- Sapolsky RM, Packan DR, Vale WW (1988). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res* 453:367-71.
- Sarkar S, Schmued L (2010). Neurotoxicity of ecstasy (MDMA): an overview. *Curr Pharm Biotechnol* 11:460-9.
- Schank JR, Ryabinin AE, Giardino WJ, Ciccocioppo R, Heilig M (2012). Stress-related neuropeptides and addictive behaviors: beyond the usual suspects. *Neuron* 76:192-208.
- Schechter MD (1991). Effect of MDMA neurotoxicity upon its conditioned place preference and

- discrimination. *Pharmacol Biochem Behav* 38:539-44.
- Schenk S (2011). MDMA ("ecstasy") abuse as an example of dopamine neuroplasticity. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1203-18.
- Scherma M, Panlilio LV, Fadda P, Fattore L, Gamaledin I, Le Foll B, Justinová Z, Mikics E, Haller J, Medalie J, Stroik J, Barnes C, Yasar S, Tanda G, Piomelli D, Fratta W, Goldberg SR (2008). Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-3-yl ester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 327:482-90.
- Schlosburg JE, Blankman JL, Long JZ, Nomura DK, Pan B, Kinsey SG, Nguyen PT, Ramesh D, Booker L, Burston JJ, Thomas EA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Liu QS, Lichtman AH, Cravatt BF (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13:1113-9.
- Schmidt CJ, Levin JA, Lovenberg W (1987). In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 36:747-55.
- Schmued LC (2003). Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res* 974:127-33.
- Schneider M (2008). Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addict Biol* 13:253-63.
- Schneider M (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res*, 10.1007/s00441-013-1581-2
- Schneider M, Drews E, Koch M (2005). Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol* 16:447-54.
- Schneider M, Koch M (2003). Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1760-9.
- Schneider M, Koch M (2005). Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 30:944-57.
- Schneider M, Koch M (2007). The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:180-6.
- Schneider M, Schomig E, Leweke FM (2008). Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13:345-57.

- Scholey AB, Parrott AC, Buchanan T, Heffernan TM, Ling J, Rodgers J (2004). Increased intensity of Ecstasy and polydrug usage in the more experienced recreational Ecstasy/MDMA users: a WWW study. *Addict Behav* 29:743-52.
- Schramm-Sapota NL, Walker QD, Caster JM, Levin ED, Kuhn CM (2009). Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animal models. *Psychopharmacology (Berl)* 206:1-21.
- Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL (2009). Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* 55:597-604.
- Schwarz JM, McCarthy MM (2008). Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J Neurochem* 105:1561-72.
- Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J Neurochem* 120:948-63.
- Sciolino NR, Zhou W, Hohmann AG (2011). Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. *Pharmacol Res* 64:226-34.
- See RE (2002). Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 71:517-29.
- Segarra AC, Agosto-Rivera JL, Febo M, Lugo-Escobar N, Menéndez-Delmestre R, Puig-Ramos A, Torres-Diaz YM (2010). Estradiol: a key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. *Horm Behav* 58:33-43.
- Serrano A, Parsons LH (2011). Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther* 132:215-41.
- Sewell RA, Ranganathan M, D'souza DC (2009). Cannabinoids and psychosis. *Int Rev Psychiatry* 21:152-62.
- Shaham Y, Hope BT (2005). The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. *Nat Neurosci* 8:1437-9.
- Shalev U, Erb S, Shaham Y (2010). Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Res* 1314:15-28.
- Shea A, Walsh C, Macmillan H, Steiner M (2005). Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. *Psychoneuroendocrinology* 30:162-78.

- Shen EY, Ali SF, Meyer JS (2011). Chronic administration of THC prevents the behavioral effects of intermittent adolescent MDMA administration and attenuates MDMA-induced hyperthermia and neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 61:1183-92.
- Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS (1996). In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17:761-6.
- Sher KJ, Bartholow BD, Wood MD (2000). Personality and substance use disorders: a prospective study. *J Consult Clin Psychol* 68:818-29.
- Shivers SC, Newton C, Friedman H, Klein TW (1994). Delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC) modulates IL-1 bioactivity in human monocyte/macrophage cell lines. *Life Sci* 54:1281-9.
- Shortall SE, Macerola AE, Swaby RT, Jayson R, Korsah C, Pillidge KE, Wigmore PM, Ebling FJ, Richard Green A, Fone KC, King MV (2012). Behavioural and neurochemical comparison of chronic intermittent cathinone, mephedrone and MDMA administration to the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*, 10.1016/j.euroneuro.2012.09.005
- Silva-Gómez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G (2003). Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res* 973:285-92.
- Silverman JL, Koenig JI (2007). Evidence for the involvement of ERbeta and RGS9-2 in 17-beta estradiol enhancement of amphetamine-induced place preference behavior. *Horm Behav* 52:146-55.
- Sim-Selley LJ (2003). Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev Neurobiol* 15:91-119.
- Sinha R (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158:343-59.
- Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV (2008). Developmental effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a review. *Behav Pharmacol* 19:91-111.
- Smith DJ, Kyle S, Forty L, Cooper C, Walters J, Russell E, Caesar S, Farmer A, McGuffin P, Jones I, Jones L, Craddock N (2008). Differences in depressive symptom profile between males and females. *J Affect Disord* 108:279-84.
- Smith JT, Waddell BJ (2003). Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J Endocrinol* 176:313-9.
- Smith Y, Raju D, Nanda B, Pare JF, Galvan A, Wichmann T (2009). The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res Bull* 78:60-8.

- Sofroniew MV (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-47.
- Solinas M, Panlilio LV, Tanda G, Makriyannis A, Matthews SA, Goldberg SR (2005). Cannabinoid agonists but not inhibitors of endogenous cannabinoid transport or metabolism enhance the reinforcing efficacy of heroin in rats. *Neuropsychopharmacology* 30:2046-57.
- Soria G, Mendizábal V, Touriño C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30:1670-80.
- Spak L, Spak F, Allebeck P (1998). Sexual abuse and alcoholism in a female population. *Addiction* 93:1365-73.
- Spano MS, Fattore L, Cossu G, Deiana S, Fadda P, Fratta W (2004). CB1 receptor agonist and heroin, but not cocaine, reinstate cannabinoid-seeking behaviour in the rat. *Br J Pharmacol* 143:343-50.
- Spear L (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417-63.
- Spear L, Brake S (1983). Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol* 16:83-109.
- Staley JK, Krishnan-Sarin S, Zoghbi S, Tamagnan G, Fujita M, Seibyl JP, Maciejewski PK, O'Malley S, Innis RB (2001). Sex differences in [123I]beta-CIT SPECT measures of dopamine and serotonin transporter availability in healthy smokers and nonsmokers. *Synapse* 41:275-84.
- Stella N (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48:267-77.
- Stella N (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58:1017-30.
- Sturman DA, Moghaddam B (2011). The neurobiology of adolescence: changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1704-12.
- Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, De Fonseca FR, Viveros MP (2009). Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19:623-32.
- Suárez J, Ortiz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, Grandes P, De Fonseca FR, Moratalla R (2011). Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience* 192:112-31.
- Suárez J, Rivera P, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Bermúdez-Silva FJ, De Fonseca FR, Viveros MP (2010). Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and

- degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Res* 1349:162-73.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S (1993). Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57:204-12.
- Sullivan JM (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn Mem* 7:132-9.
- Sundram S (2006). Cannabis and neurodevelopment: implications for psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol* 21:245-54.
- Svíženská I, Dubový P, Sulcová A (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 90:501-11.
- Taffe MA (2012). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol attenuates MDMA-induced hyperthermia in rhesus monkeys. *Neuroscience* 201:125-33.
- Tagliaferro P, Javier Ramos A, Onaivi ES, Evrard SG, Lujilde J, Brusco A (2006). Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Brain Res* 1085:163-76.
- Tahir SK, Trogadis JE, Stevens JK, Zimmerman AM (1992). Cytoskeletal organization following cannabinoid treatment in undifferentiated and differentiated PC12 cells. *Biochem Cell Biol* 70:1159-73.
- Tambaro S, Bortolato M (2012). Cannabinoid-related agents in the treatment of anxiety disorders: current knowledge and future perspectives. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7:25-40.
- Tanda G, Goldberg SR (2003). Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology (Berl)* 169:115-34.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65:320-7.
- Tau GZ, Peterson BS (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* 35:147-68.
- Terzian AL, Drago F, Wotjak CT, Micale V (2011). The Dopamine and Cannabinoid Interaction in the Modulation of Emotions and Cognition: Assessing the Role of Cannabinoid CB1 Receptor in Neurons Expressing Dopamine D1 Receptors. *Front Behav Neurosci* 5:49.
- Thanos PK, Dimitrakakis ES, Rice O, Gifford A, Volkow ND (2005). Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Behav*

- Brain Res 164:206-13.
- Touriño C, Maldonado R, Valverde O (2007). MDMA attenuates THC withdrawal syndrome in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 193:75-84.
- Touriño C, Zimmer A, Valverde O (2010). THC Prevents MDMA Neurotoxicity in Mice. *PLoS One* 5:e9143.
- Trezza V, Campolongo P (2013). The endocannabinoid system as a possible target to treat both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Front Behav Neurosci* 7:100.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross NS, Carpenter LL (2008). Childhood parental loss and adult psychopathology: effects of loss characteristics and contextual factors. *Int J Psychiatry Med* 38:329-44.
- Tzschentke TM (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56:613-72.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M (2011). Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci* 31:7700-14.
- Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T (2011). Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors* 37:1-7.
- Valle F, Bols R (1976). Age factors in sex differences in open-field activity of rats. *Learn. Behav.* 4:457-460.
- Van Den Buuse M, Garner B, Koch M (2003). Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med* 3:459-71.
- Van Os J, Bak M, Hanssen M, Bijl RV, De Graaf R, Verdoux H (2002). Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *Am J Epidemiol* 156:319-27.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-32.
- Vandevoorde S (2008). Overview of the chemical families of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 8:247-67.
- Vandrey RG, Budney AJ, Hughes JR, Liguori A (2008). A within-subject comparison of withdrawal symptoms during abstinence from cannabis, tobacco, and both substances. *Drug Alcohol Depend* 92:48-54.
- Vázquez DM, Eskandari R, Zimmer CA, Levine S, López JF (2002). Brain 5-HT receptor system in the

- stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocrinology* 27:245-72.
- Veenema AH (2009). Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front Neuroendocrinol* 30:497-518.
- Vela G, Martín S, García-Gil L, Crespo JA, Ruiz-Gayo M, Fernández-Ruiz JJ, García-Lecumberri C, Pélaprat D, Fuentes JA, Ramos JA, Ambrosio E (1998). Maternal exposure to delta9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central mu opioid receptors in adult offspring female rats. *Brain Res* 807:101-9.
- Verheyden SL, Hadfield J, Calin T, Curran HV (2002). Sub-acute effects of MDMA (+/-3,4-methylenedioxymethamphetamine, "ecstasy") on mood: evidence of gender differences. *Psychopharmacology (Berl)* 161:23-31.
- Vicentic A, Francis D, Moffett M, Lakatos A, Rogge G, Hubert GW, Harley J, Kuhar MJ (2006). Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience* 140:355-65.
- Vidal-Infer A, Roger-Sánchez C, Daza-Losada M, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M (2012). Role of the dopaminergic system in the acquisition, expression and reinstatement of MDMA-induced conditioned place preference in adolescent mice. *PLoS One* 7:e43107.
- Vinklerová J, Nováková J, Sulcová A (2002). Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. *J Psychopharmacol* 16:139-43.
- Viveros MP, De Fonseca FR, Bermudez-Silva FJ, McPartland JM (2008). Critical role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy metabolism, with phylogenetic, developmental, and pathophysiological implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:220-30.
- Viveros MP, Díaz F, Mateos B, Rodríguez N, Chowen JA (2010a). Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav* 57:405-14.
- Viveros MP, Hernández R, Martínez I, González P (1988). Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat. *Rev Esp Fisiol* 44:315-21.
- Viveros MP, Llorente R, Díaz F, Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, Rodríguez De Fonseca F, Argente J, Chowen JA (2010b). Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Horm Behav* 58:808-19.
- Viveros MP, Llorente R, López-Gallardo M, Suarez J, Bermúdez-Silva F, De La Fuente M, Rodriguez De Fonseca F, Garcia-Segura L (2009). Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in

- rats. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S217-26.
- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, Marco EM (2005a). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacol* 16:353-62.
- Viveros MP, Llorente R, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, De Fonseca FR (2012a). The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol* 26:164-76.
- Viveros MP, Marco E, File S (2005b). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81:331-42.
- Viveros MP, Marco EM, Llorente R, Lamota L (2007b). The role of the hippocampus in mediating emotional responses to nicotine and cannabinoids: a possible neural substrate for functional interactions. *Behav Pharmacol* 18:375-89.
- Viveros MP, Marco E, Llorente R, López-Gallardo M (2007a). Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast* 2007:52908.
- Viveros MP, Marco EM, López-Gallardo M, Garcia-Segura LM, Wagner EJ (2011). Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1740-51.
- Viveros MP, Mendrek A, Paus T, López-Rodríguez AB, Marco EM, Yehuda R, Cohen H, Lehrner A, Wagner EJ (2012b). A comparative, developmental, and clinical perspective of neurobehavioral sexual dimorphisms. *Front Neurosci* 6:84.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F, Baler R (2010). Addiction: decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. *Bioessays* 32:748-55.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, Jayne M, Ma Y, Wong C (2006). Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci* 26:6583-8.
- Vollenweider FX, Remensberger S, Hell D, Geyer MA (1999). Opposite effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on sensorimotor gating in rats versus healthy humans. *Psychopharmacology (Berl)* 143:365-72.
- Wagner FA, Anthony JC (2007). Into the world of illegal drug use: exposure opportunity and other mechanisms linking the use of alcohol, tobacco, marijuana, and cocaine. *Am J Epidemiol* 155:918-26.
- Walker E, Mittal V, Tessner K (2008). Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 4:189-216.
- Walker QD, Williams CN, Jotwani RP, Waller ST, Francis R, Kuhn CM (2007). Sex differences in the

- neurochemical and functional effects of MDMA in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl)* 189:435-45.
- Wallinga AE, Grahlmann C, Granneman RA, Koolhaas JM, Buwalda B (2011). Gender differences in hyperthermia and regional 5-HT and 5-HIAA depletion in the brain following MDMA administration in rats. *Brain Res* 1398:13-20.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A (2008). The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci* 38:89-97.
- Wegener N, Koch M (2009). Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res* 1253:81-91.
- Weiss I, Feldon J (2001). Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 156:305-26.
- Wenger T, Gerendai I, Fezza F, González S, Bisogno T, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V (2002). The hypothalamic levels of the endocannabinoid, anandamide, peak immediately before the onset of puberty in female rats. *Life Sci* 70:1407-14.
- Wills TA, Vaccaro D, McNamara G (1994). Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse* 6:1-20.
- Wilson RG, Tahir SK, Mechoulam R, Zimmerman S, Zimmerman AM (1996). Cannabinoid enantiomer action on the cytoarchitecture. *Cell Biol Int* 20:147-57.
- Winsauer PJ, Daniel JM, Filipeanu CM, Leonard ST, Hulst JL, Rodgers SP, Lassen-Greene CL, Sutton JL (2011). Long-term behavioral and pharmacodynamic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in female rats depend on ovarian hormone status. *Addict Biol* 16:64-81.
- Winstock AR, Griffiths P, Stewart D (2001). Drugs and the dance music scene: a survey of current drug use patterns among a sample of dance music enthusiasts in the UK. *Drug Alcohol Depend* 64:9-17.
- Wiskerke J, Irimia C, Cravatt BF, De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Pattij T, Parsons LH (2012). Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. *ACS Chem Neurosci* 3:407-17.
- Wiskerke J, Pattij T, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2008). The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addict Biol* 13:225-38.
- Wolf SA, Tauber S, Ullrich O (2008). CNS immune surveillance and neuroinflammation: endocannabinoids keep control. *Curr Pharm Des* 14:2266-78.
- Wotjak CT (2005). Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* 5:659-70.

- Xi ZX, Gilbert JG, Peng XQ, Pak AC, Li X, Gardner EL (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 26:8531-6.
- Xi ZX, Spiller K, Pak AC, Gilbert J, Dillon C, Li X, Peng XQ, Gardner EL (2008). Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects: experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats. *Neuropsychopharmacology* 33:1735-45.
- Yahyavi-Firouz-Abadi N, See RE (2009). Anti-relapse medications: preclinical models for drug addiction treatment. *Pharmacol Ther* 124:235-47.
- Yalachkov Y, Kaiser J, Naumer MJ (2010). Sensory and motor aspects of addiction. *Behav Brain Res* 207:215-22.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006). Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26:4740-51.
- Yoshino H, Miyamae T, Hansen G, Zambrowicz B, Flynn M, Pedicord D, Blat Y, Westphal RS, Zaczek R, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G (2011). Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. *J Physiol* 589:4857-84.
- Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 1:371-8.
- Zamberletti E, Prini P, Speziali S, Gabaglio M, Solinas M, Parolaro D, Rubino T (2012a). Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience* 204:245-57.
- Zamberletti E, Rubino T, Parolaro D (2012b). The endocannabinoid system and schizophrenia: integration of evidence. *Curr Pharm Des* 18:4980-90.
- Zarrindast MR, Nouri M, Ahmadi S (2007). Cannabinoid CB1 receptors of the dorsal hippocampus are important for induction of conditioned place preference (CPP) but do not change morphine CPP. *Brain Res* 1163:130-7.

ANEXO I

ANEXO I. MODELOS ANIMALES EMPLEADOS

Todos los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral cumplen con lo dispuesto en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre de 2005 (BOE nº 252) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como con la Directiva 2010/63/UE del Consejo Europeo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Asimismo, todos los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid. Durante todos los experimentos se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento de los animales y para reducir el número de animales empleado.

1. La rata *Wistar* como modelo experimental

Entre los diferentes linajes de ratas albinas (*Rattus norvegicus*) normalmente empleados en investigación el utilizado en la presente Tesis Doctoral es la rata *Wistar*. Esta cepa de rata fue desarrollada por el fisiólogo Henry Donaldson en el Instituto Wistar (Filadelfia, PA, EEUU) en 1906 para su uso en investigación médica y biológica y es la primera cepa de rata que fue empleada como modelo animal.

Las ratas *Wistar* son por lo general animales tranquilos y moderadamente prolíficos y su uso como modelo animal se ha extendido alrededor de todo el mundo. Además, son bastante resistentes a infecciones y tienen una baja o nula incidencia de aparición de tumores espontáneos.

1.1. Desarrollo de la rata *Wistar*

Las ratas recién nacidas son animales sin pelo, con los ojos cerrados y sin dientes, al principio son coloradas pero pasados dos días alcanzan el color rosado característico de esta edad. Pesan alrededor de 5 g, son activas y maman de la madre desde la primera hora de vida extrauterina (Fig 1A). El pelo corporal empieza a aparecer al cuarto día y los ojos se abren alrededor del decimotercero. A DP 10 los animales están completamente cubiertos de un vello fino y suave y comienzan a moverse

alrededor del nido (Fig. 1B). Comienzan a comer sólidos y a beber del biberón alrededor del DP 16 (Fig 1C).

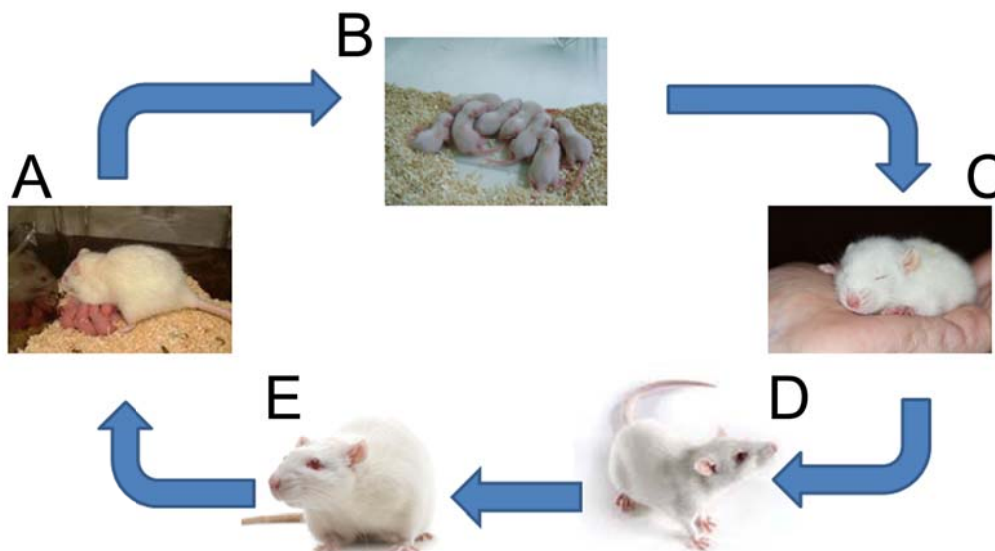


Figura 1. Etapas del desarrollo de la rata *Wistar*. A: Camada de ratas *Wistar* recién nacidas con su madre. B: Camada de ratas *Wistar* de 10 días de edad postnatal. C: Rata *Wistar* días antes del destete. D: Rata *Wistar* adolescente. E: Rata *Wistar* adulta.

El destete de los animales se realizó a DP 22, momento en el cual los animales pesan entre 30 y 50 g y son capaces de comer pienso para adultos y beber agua del biberón. Se estima que la etapa adolescente empieza en las ratas a DP 28, 7-10 días antes de comenzar la madurez sexual y termina unos pocos días después (DP 42) (Fig 1D). La madurez sexual viene indicada en los machos por un descenso de los testículos o por la separación balano-prepucial, y en las hembras por la apertura de la membrana vaginal o por la aparición del ciclo estral. Las ratas son animales poliéstricos continuos, con ligeras variaciones estacionales; las hembras son receptivas entre 6 y 12 horas y esta ventana temporal se repite cada 4 o 5 días.

La gestación de una rata dura alrededor de 21 días y el número de crías de la camada oscila entre 6 y 15 animales dependiendo de diversos factores como la edad de la madre, la cepa, su estado sanitario, número de partos previos y la alimentación. Las ratas hembra son madres excelentes que se dedican al cuidado de sus crías nada más nacer.

Las ratas de laboratorio pueden llegar a vivir 3 años, sin embargo, la gran mayoría desarrollan una enfermedad respiratoria crónica que causa una degeneración progresiva de los pulmones, por lo que no suelen sobrepasar los 2 años de edad.

2. Modelos animales basados en la teoría del neurodesarrollo

Los trastornos psiquiátricos son un problema de gran relevancia en la sociedad actual. Sin embargo, su origen no es del todo conocido, ni tampoco los mecanismos implicados en su desarrollo y evolución. A lo largo de los años se han planteado un gran número de hipótesis y modelos experimentales para estudiar las causas, origen, evolución, signos y síntomas de una gran diversidad de enfermedades de carácter neurológico y neuropsiquiátrico. En relación al origen de estas últimas se baraja desde hace unos años la hipótesis del neurodesarrollo. Según esta teoría la etiología de esta enfermedad se debería a procesos patológicos causados por factores genéticos y ambientales (estos últimos durante el período perinatal), cuyas consecuencias se harían patentes únicamente al final de la adolescencia, comienzo de la vida adulta.

A lo largo del crecimiento se han identificado periodos críticos en los que el organismo, y más particularmente su cerebro, está en pleno desarrollo y durante los cuales determinadas influencias externas, tanto ambientales como farmacológicas, pueden provocar cambios neuroendocrinos y conductuales a largo plazo. Estos periodos críticos son aquéllos que están asociados a fenómenos de plasticidad neural y a este respecto se ha descrito que tanto la adolescencia como el período perinatal temprano representan dos fases críticas del desarrollo durante las cuales el sistema nervioso muestra una plasticidad única y también una vulnerabilidad única a agentes externos.

2.1. Modelo de separación materna

El protocolo de separación materna (SM) consiste en la separación de las madres de sus crías durante 24 horas entre los DP 9 y 10, lo que origina una disrupción del normal neurodesarrollo del animal durante la etapa perinatal temprana. Se ha observado que ratas *Wistar* sometidas a tal procedimiento muestran alteraciones conductuales similares a signos de tipo psicótico, en la edad adulta alteraciones psiconeuroinmunoendocrinas que comienzan a manifestarse en la edad adolescente, alteraciones del sistema serotoninérgico en hipocampo, mesencéfalo, corteza frontal y

estriado, así como una elevación de los niveles de dopamina en el estriado y un marcado deterioro cognitivo junto con una reducción de diversos parámetros de plasticidad sináptica. También se ha descrito que los animales SM muestran una reducción del peso corporal que se extiende hasta bien entrada la adolescencia, lo que indica una disfunción metabólica, posiblemente provocada por la disminución de los niveles de leptina observados en estos animales. Además, se ha demostrado que la SM induce, a largo plazo, una significativa reducción en los niveles del receptor de glucocorticoide hipocampal, sugiriendo una alteración en los mecanismos de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), así como una marcada reducción en los niveles de testosterona y estradiol que sugieren alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) y en la función reproductora. Más recientemente hemos demostrado que la SM también modifica las respuestas relacionadas con dolor neuropático.

Por último cabe destacar que experiencias adversas en etapas tempranas de la vida pueden aumentar el riesgo de desarrollar abuso de sustancias, y en este sentido, mediante la utilización de diversos modelos de SM (diferentes protocolos y tiempos de separación de las madres con sus crías) se han podido observar diversas alteraciones sobre los efectos producidos por diferentes drogas de abuso tales como la cocaína, las anfetaminas, la morfina o el alcohol.

2.2. Modelo de adolescencia

Junto con la etapa perinatal temprana, la adolescencia es una ventana temporal para el desarrollo del sistema nervioso central en el que existe una elevada plasticidad neuronal y una particular vulnerabilidad psicobiológica tanto frente a factores ambientales estresantes como al abuso de drogas. La adolescencia es el periodo de transición entre la infancia y la edad adulta en la que se producen dramáticos cambios fisiológicos y psicológicos. Durante la adolescencia continúa el desarrollo del sistema nervioso central, incluyendo la maduración y reorganización de vías nerviosas y de los principales sistemas de neurotransmisión. Este periodo de la vida viene caracterizado por ciertas conductas típicas tales como la búsqueda de novedad o de “sensaciones nuevas”, el aumento en la frecuencia de comportamientos de riesgo y una mayor impulsividad.

Entre los jóvenes adolescentes hay una fuerte asociación entre las tendencias de búsqueda de nuevas sensaciones y de situaciones de riesgo con el consumo abusivo de

drogas. Dadas las particulares características del cerebro adolescente, el abuso de sustancias durante este periodo interfiere de forma crítica en el desarrollo neural normal de los individuos lo que puede conducir a una alteración del estatus emocional, de las capacidades cognitivas e incluso del grado de vulnerabilidad al desarrollo de nuevas dependencias.

3. El ratón como modelo experimental

El ratón (*Mus musculus*) es el primer roedor que ha sido empleado como animal de laboratorio y hoy en día es el más ampliamente utilizado en investigación. Las características que han avalado su primacía a lo largo de la historia para su uso en investigación son la cercanía de su hábitat con el de los seres humanos, su facilidad de manejo, la prolijidad en su reproducción y su pequeño tamaño, que facilita enormemente encontrar un lugar donde alojarlo. Pero además, muchos investigadores consideran al ratón como un modelo animal casi perfecto para la genética experimental debido a una serie de características de las que podemos destacar:

1. Soportan bien la consanguinidad, por lo que se pueden obtener líneas de individuos genéticamente idénticos, virtualmente homocigotos para todos sus loci.
2. Es posible criar híbridos viables y fértiles acoplando las líneas de laboratorio con varias especies derivadas de animales salvajes.
3. Se han desarrollado sobre este animal técnicas de mutagénesis dirigida que producen alteraciones heredables sobre partes específicas del genoma.

En la actualidad existen más de 1.000 cepas congénicas genéticamente definidas. Estas cepas presentan características anatómicas y fisiológicas específicas, que les confieren propiedades de modelo animal. Entre las cepas más usadas se pueden destacar:

- Ratones Swiss, CD1, NMR1: cepas no consanguíneas usadas en farmacología y toxicología.
- Ratones Balb/c: cepa consanguínea usada en la producción de anticuerpos
- Ratones C57Bl/6, C3H, SV129: cepas consanguíneas usadas como base genética en líneas modificadas genéticamente.

- Ratones inmunosuprimidos: susceptibles de desarrollar de manera natural o inducida cualquier tipo de enfermedad.

3.1. Cepa C57Bl/6

La cepa de ratón C57Bl/6 fue desarrollada por Clarence C. Little en 1921, actualmente es la línea más usada como base genética en la creación de líneas congénicas y ha sido el segundo mamífero cuyo genoma ha sido completamente secuenciado. Se caracteriza por poseer un pelaje marrón oscuro, casi negro, y un temperamento irritable (Fig. 2). Tienen tendencia a morder y no pueden manipularse tan fácilmente como otras cepas de ratón de laboratorio.



Figura 2. Ratón C57Bl/6 adulto.

3.2. Ratones *knock-out* condicionales

Los ratones *knock-out* son animales a los que, mediante manipulación genética, se les ha suprimido la expresión de un gen específico, bien sustituyendo el gen original en su locus por una versión modificada, o bien a través de la extracción de uno o varios exones para generar una versión no funcional de la proteína.

Entre los diversos métodos para generar líneas de animales *knock-out* nos encontramos con los animales *knock-out* condicionales, en los que la supresión del gen se realiza dentro de un tejido determinado mediante el uso de recombinasas sitio-específicas. La enzima más empleada para la construcción de animales *knock-out* condicionales es la enzima Cre, la cual reconoce una secuencia específica de 34 pb conocida como *loxP*. Cuando la recombinasa Cre encuentra dos secuencias *loxP* con la

misma orientación en el mismo segmento de ADN, todo lo que se halla entre estas dos secuencias es eliminado mediante la actividad de cortado y pegado que presenta esta enzima.

En la fig. 3 se detallan los pasos para la generación de animales *knock-out* condicionales. En resumen se trataría de generar un ratón que porte un gen determinado “floxeado”, o lo que es lo mismo, cuya secuencia se encuentre comprendida entre dos sitios *loxP* en el mismo sentido (Fig. 3 animal de la derecha). Este ratón se cruzaría con un animal transgénico para la recombinasa Cre con una expresión limitada a un tejido específico mediante el uso de promotores específicos de tejido (Fig. 3 animal de la izquierda). Las crías resultantes de este cruzamiento no expresarán el gen de nuestra elección en el tejido en el que se expresa la recombinasa.

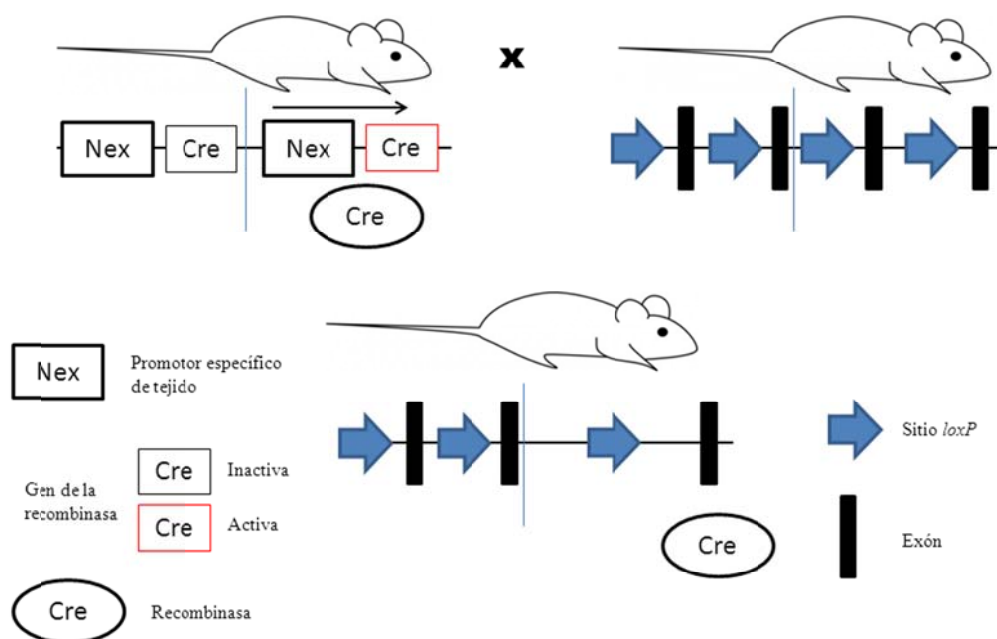


Figura 3. Obtención de ratones *knock-out* condicionales empleando como promotor específico de tejido el promotor *Nex* (que sólo permite la transcripción en terminales nerviosos glutamatérgicos). Modificado de Benavides y Guénet, 2003)

4. Modelo de condicionamiento y extinción de miedo

El miedo es una respuesta adaptativa que ha evolucionado para proteger al individuo de daños potenciales provenientes del exterior. No obstante, cuando el miedo ante una situación es excesivo o desproporcionado puede llegar a producir alteraciones de la ansiedad.

Clásicamente la ansiedad ha sido tratada mediante la administración de benzodiazepinas e inhibidores de la recaptura de serotonina, que producen una mejoría de la sintomatología, aunque al retirarse el tratamiento puede haber recaídas. Actualmente, el tratamiento psicológico más efectivo contra la ansiedad ante un estímulo aversivo es el conocido como terapia cognitiva-conductual. Uno de los aspectos más importantes es la “desensibilización” que consiste en exponer gradualmente al paciente al estímulo aversivo en ausencia de peligro para el sujeto. A pesar del éxito que tiene esta terapia en el tratamiento de trastornos de la ansiedad, como por ejemplo fobias, no todos los pacientes son capaces de completarla, y por tanto, puede resultar difícil su recuperación. En esta coyuntura, resulta especialmente conveniente una mejor comprensión de los mecanismos neurales que subyacen al miedo y a su reducción. Por este motivo se han desarrollado una serie de modelos animales que permiten conocer cuáles son los circuitos que actúan sobre el condicionamiento y la extinción del miedo. Uno de los métodos para estudiar estos aspectos en el laboratorio, consiste en emparejar un estímulo condicionado neutro (EC; como por ejemplo luz o un sonido) con un estímulo aversivo incondicionado (EI; por ejemplo un shock eléctrico). Tras la exposición a esta asociación, el sujeto aprende que el EC predice la aparición del EI y la exposición al EC provoca una variedad de respuestas de miedo, como por ejemplo la conducta de *freezing* de los roedores, que consiste en una paralización o inmovilidad prácticamente total del animal. Una vez adquirido este aprendizaje, el miedo al EC puede extinguirse mediante una exposición repetida al EC en ausencia del estímulo aversivo. Una de las ventajas de este modelo es que pueden observarse una serie de respuestas que recuerdan a ciertos signos o síntomas que exhiben pacientes con trastornos de ansiedad y, por tanto, puede emplearse para probar diversos métodos para reducir esta sintomatología. Sin embargo, esta metodología tiene también una importante limitación dado que los procesos de extinción del miedo son altamente eficaces y tras una sesión de extinción se provoca una reducción prominente de las

respuestas de miedo lo que imposibilita el testado de terapias farmacológicas crónicas o a largo plazo.

Por todo lo anteriormente expuesto, en el Bloque III de la presente Tesis Doctoral propusimos y caracterizamos un modelo animal de condicionamiento y extinción de miedo en el que los animales mostraron un comportamiento de *freezing* continuo, incluso tras haber sido expuestos a tres días consecutivos de sesiones de extinción.

5. Bibliografía

- Acosta M, Gallo V, Batshaw M (2002). Brain development and the ontogeny of developmental disabilities. *AdvPediatr* 49:1-57.
- Adriani W, Laviola G (2004). Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *BehavPharmacol* 15:341-52.
- Andersen S (2008). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *NeurosciBiobehav Rev* 27:3-18.
- Benavides FJ, Guénet JL (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares.
- Burke NN, Llorente R, Marco EM, Tong K, Finn DP, Viveros MP, Roche M (2013). Maternal deprivation is associated with sex-dependent alterations in nociceptive behaviour and neuroinflammatory mediators in the rat following peripheral nerve injury. *The Journal of Pain* 14(10):1173-84.
- De la Fuente M, Llorente R, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, Viveros MP (2009). Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1153:176-83.
- Ellenbroek BA, Cools AR (1995). Maternal separation reduces latent inhibition in the conditioned taste aversion paradigm. *Neuroscience research communications* 17:27-33.

- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res.* 30:251-60.
- Fatemi S, Folsom T (2009). The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 35:528-48.
- Fernández-Espejo E, Viveros MP, Núñez L, Ellenbroek BA, Rodríguez de Fonseca F (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology* 206:531-49.
- Flagel SB, Vazquez DM, Robinson TE (2003). Manipulations during the second, but not the first, week of life increase susceptibility to cocaine self-administration in female rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1741–51.
- Garey L (2010). When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J Anat* 217:324-33.
- Graham BM, Milad MR (2011). The study of fear extinction: implications for anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 168:1255-65.
- Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG (2001). Early neonatal experience of Long–Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. *Psychopharmacology* 157:305–12.
- Lane-Petter W (1976). The laboratory mouse. En: Hume CW. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 5ª ed. Edimburgo: Churchill Livingstone.
- Lane-Petter W (1976). The laboratory rat. En: Hume CW. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 5ª ed. Edimburgo: Churchill Livingstone.
- Li Y, Robinson TE, Bhatnagar S (2003). Effects of maternal separation on behavioural sensitization produced by repeated cocaine administration in adulthood. *Brain Res* 960:42–7.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP (2007). Early maternal deprivation and neonatal single administration

- with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:636–50.
- Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC, Ramirez MJ, De Kloet ER, Viveros MP (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J Neuroendocrinol* 23:329-44.
- Llorente R, O'Shea E, Gutierrez-Lopez MD, Llorente-Berzal A, Colado MI, Viveros MP (2010). Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. *NeurosciLett* 479:112-7.
- Marco EM, Adriani W, Canese R, Podo F, Viveros MP, Laviola G (2007). Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86:334-45
- Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros MP (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: Altered responses to cannabinoid exposure. *NeurosciBiobehav Rev* 33:498-507.
- Marco EM, Valero M, de la Serna O, Aisa B, Borcel E, Ramirez MJ, Viveros MP (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*. 68:223-31
- Mela V, Llorente-Berzal Á, Díaz F, Argente J, Viveros MP, Chowen JA (2012). Maternal deprivation exacerbates the response to a high fat diet in a sexually dimorphic manner. *PLoS One* 7:e48915.
- Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ (2007). Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *BiochemPharmacol* 73:321–30.
- Riebe CJ, Pamplona FA, Kamprath K, Wotjak CT (2012). Fear relief-toward a new conceptual frame work and what endocannabinoids gotta do with it. *Neuroscience* 204:159-85.

- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol.Psychiatry* 7:609-16.
- Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *NeurosciBiobehav Rev* 24:417-63.
- Viveros MP, Llorente R, Suárez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, Rodríguez de Fonseca F (2012). The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol* 26:164-76.
- Weiss I, Feldon J (2001). Enviromental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology (Berl.)* 156:305-26.

ANEXO II

ANEXO II. ANTICUERPOS Y FÁRMACOS UTILIZADOS

1. Anticuerpos utilizados

Inmunohistoquímica

Primarios

Polyclonal rabbit anti-rat BDNF

Antígeno	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:200
Casa comercial	Santa Cruz Biotechnology

Polyclonal rabbit anti-rat CB1 receptor

Antígeno	Receptor cannabinoide CB1
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:500
Casa comercial	Cortesía del Prof. Ken Mackie

Polyclonal rabbit anti-rat CB1 receptor

Antígeno	Receptor cannabinoide CB1
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:500
Casa comercial	Thermo Scientific

Monoclonal rabbit anti-rat GFAP

Antígeno	Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:1000
Casa comercial	SIGMA

Polyclonal rabbit anti-rat GFAP

Antígeno	Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:1000
Casa comercial	Dako

Polyclonal rabbit anti-rat Iba-1

Antígeno	Molécula mediadora de la unión de calcio ionizado tipo 1 específica de macrófagos y microglía
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:2000
Casa comercial	Wako Pure Chemical Industries

Polyclonal rabbit anti-rat serotonin transporter

Antígeno	Transportador de serotonina
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:500
Casa comercial	Calbiochem

Secundarios

Biotynilated donkey anti-rabbit

Antígeno	Inmunoglobulina G de conejo
Animal en el que se desarrolló	Burro
Concentración de trabajo	1:300
Conjugado	Biotina
Casa comercial	Healthcare

Biotynilated goat anti-rabbit

Antígeno	Inmunoglobulina G de conejo
Animal en el que se desarrolló	Cabra
Concentración de trabajo	1:300
Conjugado	Biotina
Casa comercial	Healthcare

Biotynilated goat anti-rabbit

Antígeno	Inmunoglobulina G de conejo
Animal en el que se desarrolló	Cabra
Concentración de trabajo	1:300
Conjugado	Biotina
Casa comercial	Pierce Laboratories

Western blot

Primarios

Polyclonal rabbit anti-rat CB1 receptor

Antígeno	Receptor cannabinoide CB1
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:250
Casa comercial	Thermo Scientific

Polyclonal rabbit anti-rat CB2 receptor

Antígeno	Receptor cannabinoide CB2
Animal en el que se desarrolló	Conejo
Concentración de trabajo	1:100
Casa comercial	Pierce Laboratories

Monoclonal mouse anti-rat β -actin

Antígeno	Actina β
Animal en el que se desarrolló	Ratón
Concentración de trabajo	1:750 y 1:10.000
Casa comercial	SIGMA

Secundarios

Donkey anti-rabbit HRP conjugated

Antígeno	Inmunoglobulina G de conejo
Animal en el que se desarrolló	Burro
Concentración de trabajo	1:600
Conjugado	Peroxidasa
Casa comercial	Thermo Scientific

Goat anti-mouse peroxidase conjugated

Antígeno	Inmunoglobulina G de ratón
Animal en el que se desarrolló	Cabra
Concentración de trabajo	1:2500
Conjugado	Peroxidasa
Casa comercial	SIGMA

Goat anti-rabbit peroxidase conjugated

Antígeno	Inmunoglobulina G de conejo
Animal en el que se desarrolló	Cabra
Concentración de trabajo	1:10.000
Conjugado	Peroxidasa
Casa comercial	Abcam

Sheep anti-mouse peroxidase conjugated

Antígeno	Inmunoglobulina G de ratón
Animal en el que se desarrolló	Oveja
Concentración de trabajo	1:10.000
Conjugado	Peroxidasa
Casa comercial	Amersham

2. Fármacos utilizados
2.1. Drogas de abuso
Psicoestimulantes

Éxtasis (MDMA)

Nomenclatura: 3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina

Casa comercial: Lipomed AG Laboratories

Experimento Bloque I Capítulo 2

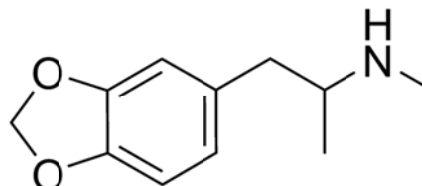
Dosis: 2.5 mg/kg/cada 2 días i.p.

Duración: DP 35-41

Experimento Bloque II Capítulo 4

Dosis: 2 x 10 mg/kg cada 5 días s.c.

Duración: DP 30-45


Cocaína

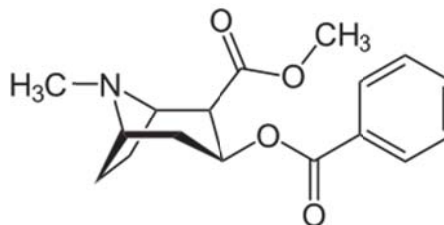
Nomenclatura: (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato de metilo

Casa comercial: Alcaliber

Experimento Bloque I Capítulo 3

Dosis: 8 mg/kg/día i.p.

Duración: DP 28-42



Agonistas cannabinoides

CP-55,940

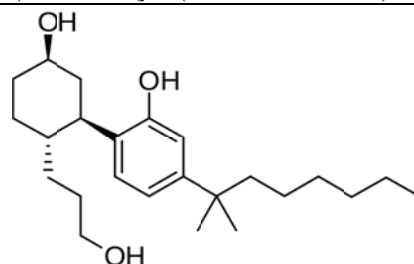
Nomenclatura: 2-[(1S,2R,5S)-5-hidroxi-2-(3-hidroxipropil) ciclohexil]-5-(2-metiloctano-2-il)fenol

Casa comercial: Tocris

Experimento Bloque I Capítulo 1

Dosis: 0.4 mg/kg/día i.p.

Duración: DP 28-42



Delta-9-tetrahidrocannabinol (THC)

Nomenclatura: Tetrahydro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6H-dibenzeno[b,d]piran-1-ol

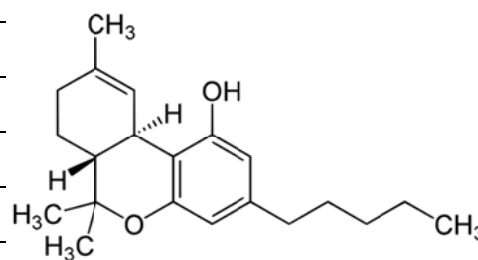
Casa comercial: THC Pharm GmbH

Experimento Bloque II Capítulo 4

Dosis nº1: 2.5 mg/kg/día i.p. DP 28-34

Dosis nº2: 5 mg/kg/día i.p. DP 35-40

Dosis nº3: 10 mg/kg/día i.p. DP 41-45



2.2. Fármacos moduladores de la respuesta cannabinoide

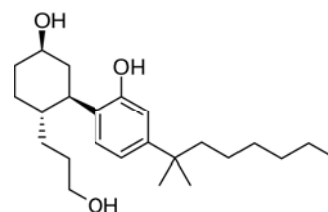
Agonistas cannabinoides

CP-55,940

Casa comercial: SIGMA

Dosis: 1 µg/kg y 50 µg/kg

Acción: Agonista del receptor CB1

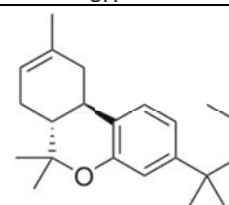


JWH133

Casa comercial: Tocris

Dosis: 3 mg/kg

Acción: Agonista del receptor CB2



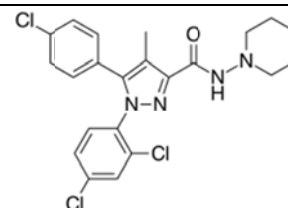
Antagonistas cannabinoides

SR141716 (Rimonabant)

Casa comercial: Cayman Chemical

Dosis: 3 mg/kg

Acción: Antagonista del receptor CB1

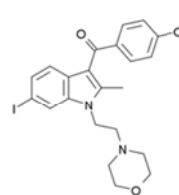


AM630

Casa comercial: Tocris

Dosis: 3 mg/kg

Acción: Antagonista del receptor CB2



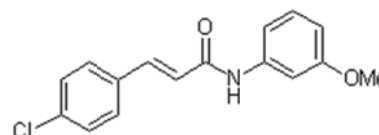
Antagonistas vaniloides

SB366791

Casa comercial: Tocris

Dosis: 1 mg/kg y 3 mg/kg

Acción: Antagonista del receptor TRPV1



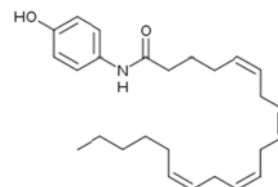
Inhibidores de la recaptación

AM404

Casa comercial: SIGMA

Dosis: 3 mg/kg

Acción: Inhibidor del transportador cannabinoide

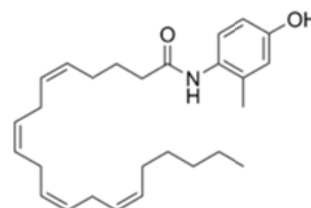


VDM11

Casa comercial: Cayman Chemical

Dosis: 3 mg/kg

Acción: Inhibidor del transportador cannabinoide



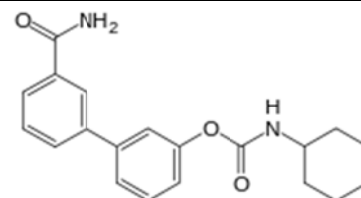
Inhibidores de la degradación

URB597

Casa comercial: SIGMA

Dosis: 0.3 mg/kg y 1 mg/kg

Acción: Inhibidor de la FAAH

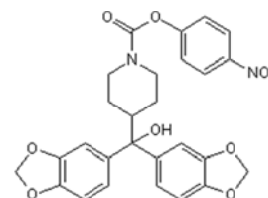


JZL184

Casa comercial: Tocris

Dosis: 4 mg/kg y 8 mg/kg

Acción: Inhibidor de la MAGL



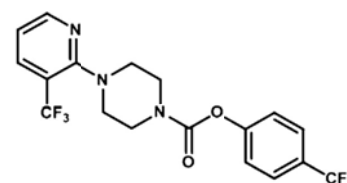
Actividad mixta

OMDM198

Cedido por el Dr. Vincenzo Di Marzo

Dosis: 1 mg/kg, 2.5 mg/kg y 5 mg/kg

Acción: Antagonista del receptor TRPV1 e inhibidor de la FAAH



ANEXO III

ANEXO III. PRUEBAS CONDUCTUALES EMPLEADAS

El sistema nervioso permite al individuo generar conductas que le permitan mantener su propia homeostasis y por ende su supervivencia, y asegurar la continuidad de la especie. De hecho, los animales exhiben conductas de búsqueda de alimento y bebida, comportamientos conducentes a la protección frente a depredadores o agentes adversos externos, conductas sexuales específicas de cada especie o comportamientos de cuidado materno, entre otros. Así pues, uno de los aspectos más importantes en la utilización y caracterización de modelos animales en psicofisiología y psicofisiopatología es el análisis de la conducta, que debe ser lo más completo e integrado posible incluyendo baterías de pruebas *ad hoc*. A lo largo de la presente Tesis Doctoral hemos procedido de acuerdo con este criterio al diseñar los protocolos experimentales.

Como ha sido previamente indicado en el Anexo I, la mayoría de experimentos efectuados con modelos animales han sido realizados en roedores (ratas y ratones mayoritariamente). Los modelos conductuales que se desarrollan en estas especies tienen en cuenta pautas de comportamiento espontáneo clásicas de los roedores entre las que destacan su tendencia a la exploración, su aversión a las alturas y a los espacios abiertos, una elevada capacidad de memoria y aprendizaje y un cuidado excelente de los recién nacidos.

Aparte del comportamiento espontáneo de los roedores, también se han desarrollado, a partir de los estudios de Ivan Pavlov, una serie de modelos conductuales que se basan en el condicionamiento clásico. En resumen, cuando el animal aprende a relacionar un estímulo incondicionado, como por ejemplo la comida, con un estímulo neutro, el sonido de una campana, al final la respuesta frente al estímulo neutro es la misma que cuando sólo se presenta el estímulo incondicionado, es decir, salivación.

1. Análisis del comportamiento materno

El comportamiento materno en los mamíferos no primates ha sido frecuentemente caracterizado como una conducta estereotipada, invariante o innata que

emerge como resultado de la combinación de señales endocrinas con las etapas finales de la preñez y las propiedades estimulantes de las crías. Sin embargo, existen estudios que demuestran variaciones del comportamiento materno entre madres dentro de la misma especie. Estas variaciones en la cantidad y/o la cualidad de la conducta materna pueden producir alteraciones conductuales a largo plazo en las crías cuando éstas alcanzan la edad adulta. A este respecto, resulta de indudable utilidad el estudio del comportamiento materno en los modelos animales de neurodesarrollo en los que el agente estresante es suministrado durante la etapa perinatal temprana, es decir, cuando las crías todavía dependen de su madre.

Figura 1. Conducta materna

Observación de la conducta materna tanto en la fase lumínica como en la fase oscura del ciclo

6:00, 10:00, 13:00, 17:00, 20:00

Por cada periodo 25 observaciones con un intervalo de 3 minutos entre cada una de ellas

Parámetros analizados



Postura de espalda arqueada



Lamido y aseo de las crías

2. Análisis de la actividad motora y exploratoria: Campo abierto

La observación del comportamiento de los animales en esta prueba permite el análisis de parámetros motores, actividad motora horizontal y vertical, y la observación de comportamientos relevantes tales como el atusamiento rostral o *grooming*. En estos aparatos que pueden ser circulares o cuadrados, los animales evitan los riesgos potenciales asociados a la zona central, y muestran una clara preferencia por las zonas

próximas a las paredes y esquinas que ofrecen cierta protección. Esta tendencia de las ratas a desplazarse en contacto con paredes se denomina tigmotaxis. Esta aversión natural a los espacios abiertos puede emplearse para estudiar la emotividad del animal mediante la medición del tiempo que el animal se encuentra en la periferia o en el centro del aparato.

Figura 2. Campo abierto

Duración: variable

Parámetros analizados:

Distancia recorrida

Tiempo de movimiento

Tiempo en el centro o en la periferia del aparato (segundos o porcentaje)

Latencia en entrar al centro del aparato

Tiempo y frecuencia de posiciones erguidas

Atusamiento rostral o *grooming*



3. Análisis de la actividad motora y exploratoria: Tablero con agujeros

Una variante del estudio del comportamiento espontáneo de los animales en un espacio cerrado es la introducción de estímulos en la zona central del aparato, estímulos que frecuentemente se encuentran representados por la introducción de agujeros. En este tipo de paradigmas, los animales se exponen a una situación de conflicto entre su natural tendencia exploratoria (en este caso actividad exploratoria dirigida a estímulos, los agujeros) y su miedo a aventurarse en la zona central del tablero donde se

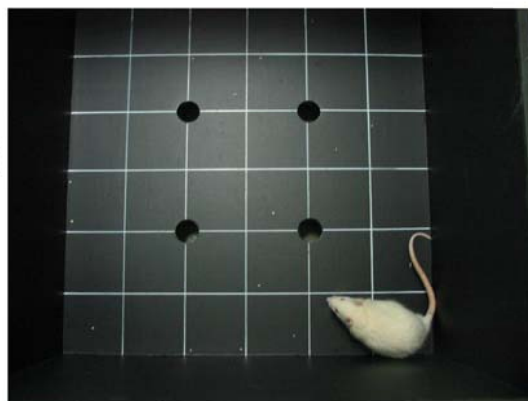
encuentran los agujeros. La evaluación del comportamiento en esta prueba ofrece la posibilidad de evaluar de forma independiente la actividad motora y la actividad exploratoria. El empleo del tablero con agujeros permite también la estimación complementaria del estado emocional de los animales ya que ha sido establecida una estrecha relación entre los parámetros exploratorios y los niveles de ansiedad de los individuos.

Figura 3. Tablero con agujeros

Duración: 5 minutos

Parámetros analizados:

Distancia recorrida
Tiempo de movimiento
Tiempo en el centro o en la periferia del aparato (segundos o porcentaje)
Latencia en entrar al centro del aparato
Tiempo y frecuencia de posiciones erguidas
Autosamamiento rostral o *grooming*
Frecuencia y tiempo de exploración



4. Evaluación de los niveles de ansiedad: Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado es un modelo conductual validado para el análisis de los niveles de ansiedad en roedores que se basa en su natural aversión por los espacios abiertos y por las alturas. En este modelo, la principal medida de ansiedad viene dada por la frecuencia de entradas y por el tiempo transcurrido en los brazos abiertos, empleándose, por norma general, los correspondientes porcentajes en el análisis de datos. Este paradigma proporciona medidas adicionales de actividad locomotora a través del parámetro correspondiente al número de entradas en brazos cerrados.

Figura 4. Laberinto en cruz elevado

Duración: 5 minutos

Parámetros analizados:

Porcentaje de entradas y tiempo en brazos abiertos
Entradas en brazos cerrados



5. Evaluación de la memoria y aprendizaje: Test de reconocimiento de objetos

Existen diferentes tipos de pruebas pensadas para evaluar la capacidad de retención de información y la capacidad cognitiva en procesos que requieren un aprendizaje por parte de los animales. Algunas de estas pruebas evalúan lo que se conoce como memoria de trabajo. La memoria de trabajo es un tipo de memoria a corto plazo necesaria para almacenar cierta información que permita al individuo realizar alguna tarea concreta. En el caso de los roedores estas pruebas pueden basarse en la tendencia que presentan estos animales a explorar. Por ejemplo, cuando los roedores son expuestos a un objeto que ya han explorado (familiar o conocido) y, simultáneamente, a otro que para ellos es desconocido (nuevo), tienden a pasar más tiempo explorando el segundo, ya que el primero permanece en su memoria. Es en esta preferencia espontánea que desarrollan los roedores por el objeto nuevo en la que se basa la prueba que hemos usado para medir el nivel cognitivo de los animales: el test de reconocimiento de objetos. En nuestro caso, el periodo comprendido entre la fase de entrenamiento, en la que los animales son expuestos a dos objetos “familiares” y la del test, en la que los animales son expuestos al objeto “familiar” y al “nuevo”, fue de 4 horas. Los parámetros que suelen evaluarse en esta prueba son los siguientes:

- Índice de discriminación (ID): Diferencia entre el tiempo que explora el objeto nuevo (N) y el familiar (F), dividido por el tiempo total que el animal ha explorado ambos objetos: $ID = (N - F) / (F + N)$.
- El tiempo total de exploración de ambos objetos durante el entrenamiento y/o la prueba de memoria.
- Tiempo de latencia de exploración: lo que tarda en explorar el primer objeto.

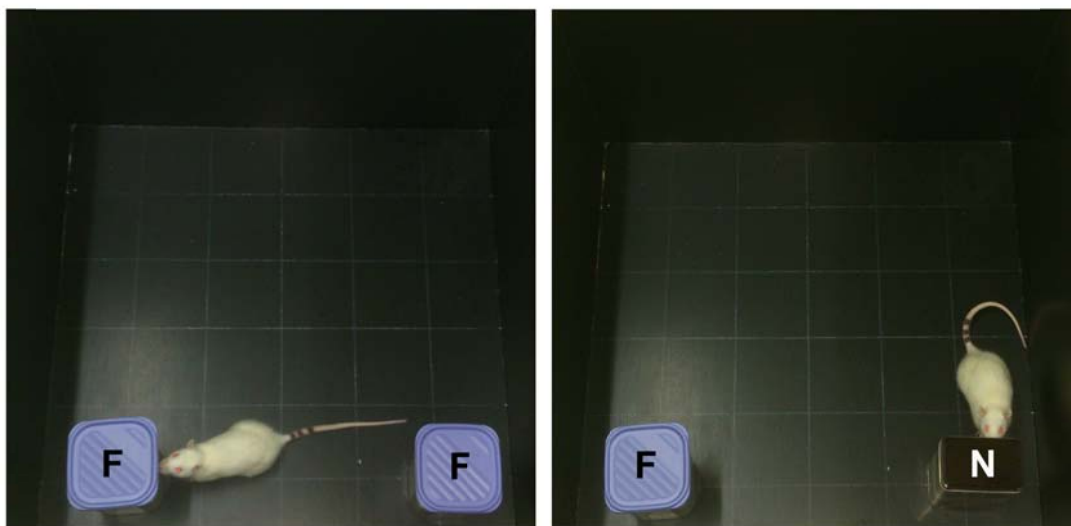
- Tiempo de exploración de cada objeto y/o frecuencia durante el entrenamiento: permite estudiar la existencia de una preferencia por alguno de los objetos. En caso de preferencia ese animal debe ser excluido del análisis estadístico.
- Otros comportamientos: normalmente conductas que se relacionan con las observables en el campo abierto tales como tiempo o frecuencia de *grooming*, frecuencia y tiempo de postura erguida, etc.

Figura 5. Test de reconocimiento de objetos

Habitación: 5 días de habitación al campo abierto. 5 minutos/día

Prueba:

- Entrenamiento: exploración de dos objetos iguales, conocidos como familiares (F), durante un tiempo máximo de 30 segundos.
Duración máxima del entrenamiento: 4 minutos.
- Test: se realiza 4 horas después del entrenamiento. Uno de los objetos familiares se cambia por uno nuevo (N). Duración: 3 minutos.



6. Evaluación de la entrada de información sensomotora y de la capacidad de atención: Test de la inhibición prepulso

La inhibición prepulso es la supresión del reflejo de sobresalto que ocurre cuando el estímulo principal es precedido por uno de menor intensidad. Esta medida de filtrado de entrada de información sensomotora se cree que está controlada por estructuras localizadas en la parte inferior del tronco encefálico y mediada por aferentes provenientes del prosencéfalo. En algunas alteraciones neuropsiquiátricas, se ha

observado una deficiencia de la inhibición prepulso. Por ejemplo, se han relacionado alteraciones en este test con el déficit de filtrado de la entrada de información sensoriomotora y de la capacidad de atención presentes en la esquizofrenia. También se ha observado que el tratamiento con fármacos liberadores de serotonina pueden conducir a una disminución del porcentaje de inhibición prepulso.

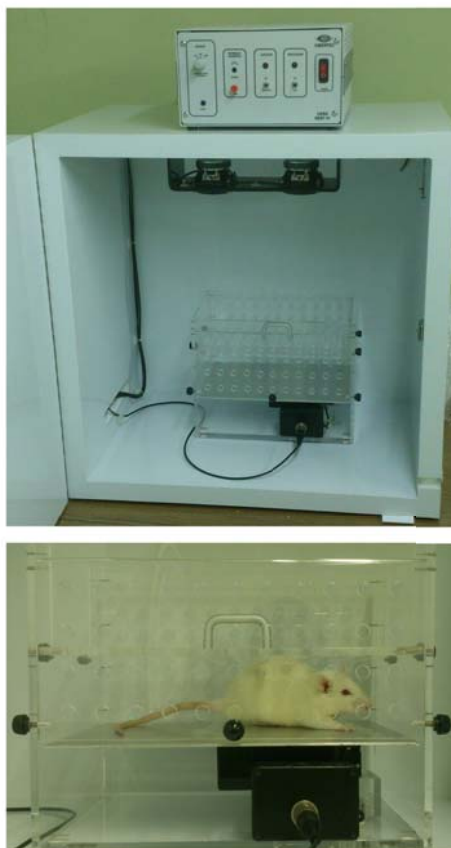
Figura 6. Test de la inhibición prepulso

El animal es sometido a:

- 5 minutos de habituación con sonido de fondo (65 dB)
- 10 ensayos con el pulso (120 dB)
- 10 bloques de prepulso. Cada bloque consta de:
 - o Un pulso de 120 dB
 - o Un prepulso de 73 dB + pulso de 120 dB
 - o Un prepulso de 75 dB + pulso de 120 dB
 - o Un prepulso de 80 dB + pulso de 120 dB
 - o Ensayo sin estímulo

Parámetros analizados:

Porcentaje de inhibición prepulso



En roedores, el porcentaje de inhibición prepulso se mide a través de la respuesta de sobresalto ante un estímulo sonoro. De esta manera el animal presentaría unos valores normales en este test si el sobresalto a un estímulo sonoro fuese menor cuando este viniera precedido de uno de menor intensidad. El método más comúnmente empleado para conocer el porcentaje de inhibición prepulso viene dado por la fórmula: $\%PPI = 100 \times [(RS_{est} - RS_{pp}) / RS_{est}]$, donde:

- %PPI, es el porcentaje de inhibición prepulso
- RS_{est} , es la respuesta de sobresalto frente al estímulo

- RSpp, es la respuesta de sobresalto frente al estímulo precedido de un prepulso.

7. Evaluación de la capacidad reforzante de un fármaco: test de la preferencia condicionada de lugar

En este test se emplea una caja con dos compartimentos diferentes (distintas decoraciones en las paredes o diferentes tipos de suelo, entre otros) separadas por una partición. Los animales son confinados en una de las mitades tras la administración de una droga, donde experimentan los efectos del fármaco. En un número igual de ocasiones, se les inyecta con un placebo o con el vehículo y se les deja en la otra mitad del aparato. Tras una serie de repeticiones los animales son colocados de nuevo en el aparato, pero esta vez sin la separación y se les permite deambular entre ambos compartimentos libremente. El parámetro que se evalúa es la cantidad de tiempo que el animal pasa en cada una de los compartimentos. Podemos decir que una droga o fármaco posee propiedades reforzantes si el animal ha pasado más tiempo en el área asociada a la droga que en la asociada al placebo o vehículo.

Figura 7. Test de la preferencia condicionada de lugar

Precondicionamiento

Condicionamiento: se alternan las siguientes opciones

- Emparejamiento de uno de los compartimentos con la droga
- Emparejamiento del otro compartimento con el vehículo

Postcondicionamiento

Parámetros analizados:

Tiempo que el animal pasa en cada compartimento el día del precondicionamiento, como medida de exclusión en el caso de preferencia por uno de los compartimentos.

Tiempo que el animal pasa en cada compartimento el día del postcondicionamiento



El test de la preferencia condicionada de lugar se basa en el condicionamiento Pavloviano o condicionamiento clásico, que consiste en emparejar un estímulo neutro con un estímulo incondicionado reforzante, provocando así que el primero adquiera propiedades de refuerzo. En el caso que nos ocupa la localización donde se deja el animal una vez que ha sido administrado con la droga se convierte en un estímulo condicionado que evoca los efectos reforzantes del fármaco, de ahí que el animal pase más tiempo en el área asociada a la droga.

8. Evaluación del condicionamiento y extinción del miedo

El condicionamiento del miedo es un modelo conductual basado en el condicionamiento Pavloviano. Sin embargo, a diferencia del modelo anterior, los roedores aprenden a “predecir” eventos adversos. En este paradigma se asocia un estímulo incondicionado de tipo aversivo (normalmente un shock eléctrico) con un estímulo neutro (en nuestro caso un estímulo sonoro), lo que provoca la expresión de respuestas asociadas al miedo cuando el animal es sometido al estímulo neutro.

La extinción del miedo consiste en una exposición repetida del sujeto al estímulo neutro utilizado durante el condicionamiento pero en esta ocasión sin que vaya sucedido del estímulo aversivo. De esta manera el animal se encuentra sometido a un reaprendizaje y va gradualmente disminuyendo la cantidad de respuestas asociadas al miedo ante la presentación del estímulo neutro.

Figura 8. Condicionamiento y extinción del miedo

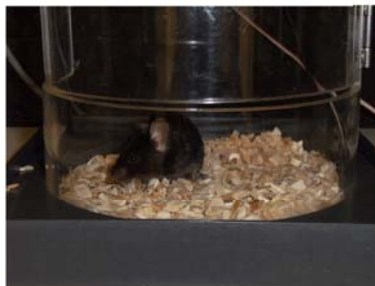
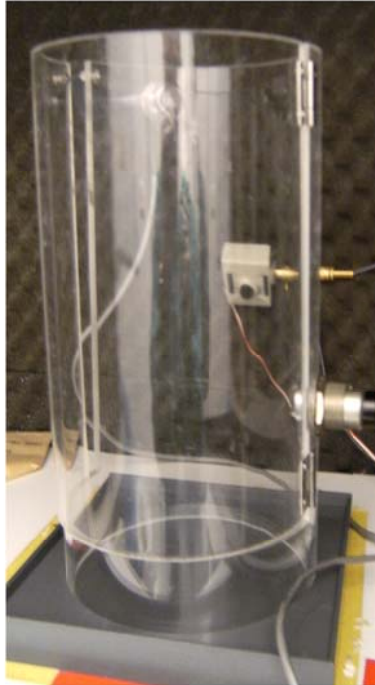
Parámetros analizados: Porcentaje de *freezing*

Condicionamiento



Día 0: Se empareja el estímulo neutro (tono de 9kHz, 80 dB durante 20s) con un estímulo aversivo (shock eléctrico de 1.5 mA durante 2s)

Extinción



Días 1, 2, 3 y 10 tras el condicionamiento: El animal es expuesto cada día al estímulo neutro durante 180s.

9. Bibliografía

Baddeley A (1992). Working memory. Science 255:556-9.

- Champagne F, Francis D, Mar A, Meaney M (2003). Variations in maternal care in the rat as mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 79:359-71
- Dimitsantos E, Escorihuela RM, Fuentes S, Armario A, Nadal R (2007). Litter size affects emotionality in adult male rats. *Physiol Behav* 92:708-16.
- Ennaceur A, Delacour J (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.
- Fernandes C, File SE (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54:31-40.
- File SE (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. En: Elliot JM, Heal DJ, Marsden CA, eds. *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. Nueva York (NY): Wiley.
- File SE, Wardill AG (1975). Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44:53-9.
- Graham BM, Milad MR (2011). The study of fear extinction: implications for anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 168:1255-65.
- Graham FK (1975). The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 12:238-48.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156:117-54.
- Li Y, Ji YJ, Jiang H, Liu DX, Zhang Q, Fan SJ, Pan F (2009). Effects of unpredictable chronic stress on behavior and brain-derived neurotrophic factor expression in CA3 subfield and dentate gyrus of the hippocampus in different aged rats. *Chin Med J (Engl.)* 122:1564-9.
- Marren S (2001). Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897-931.

- McKinn W (2007). Drugs and behavior. An introduction to behavioral pharmacology. 6^a ed. Upper Saddler River (NJ): Pearson Education Inc.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-67.
- Rodríguez Echandía EL, Broitman ST, Fóscolo MR (1987). Effect of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 26:207-10.
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350:21-9.
- Weiss IC, Feldon J (2001). Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology (Berl.)* 156:305-26.

ANEXO IV

Species differences in cannabinoid receptor 2 (*CNR2* gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands

Q.-R. Liu[†], C.-H. Pan^{†,∞}, A. Hishimoto[†], C.-Y. Li[†],
Z.-X. Xi[‡], A. Llorente-Berzal[§], M.-P. Viveros[§], H.
Ishiguro^{†,¶}, T. Arinami[¶], E. S. Onaivi^{*},^{†,**} and
G. R. Uhl[†]

[†]Mol. Neurobiol. Branch and [‡]Chemical Biol. Res. Branch, NIDA-IRP, NIH, Baltimore, MD, USA, [§]Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, [¶]University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, [∞]Department of Psychiatry, Taipei City Hospital and Taipei City Psychiatric Center, Taipei, Taiwan and ^{**}William Paterson University, Wayne, NJ, USA

*Corresponding author: E. S. Onaivi, Department of Biology, William Paterson University, Wayne, NJ 07470, USA. E-mail: OnaiviE@wpunj.edu or EOnaivi@intra.nida.nih.gov

Cannabinoids, endocannabinoids and marijuana activate two well-characterized cannabinoid receptors (CB-Rs), CB1-Rs and CB2-Rs. The expression of CB1-Rs in the brain and periphery has been well studied, but neuronal CB2-Rs have received much less attention than CB1-Rs. Many studies have now identified and characterized functional glial and neuronal CB2-Rs in the central nervous system. However, many features of CB2-R gene structure, regulation and variation remain poorly characterized in comparison with the CB1-R. In this study, we report on the discovery of a novel human CB2 gene promoter transcribing testis (CB2A) isoform with starting exon located ca 45 kb upstream from the previously identified promoter transcribing the spleen isoform (CB2B). The 5' exons of both CB2 isoforms are untranslated 5'UTRs and alternatively spliced to the major protein coding exon of the CB2 gene. CB2A is expressed higher in testis and brain than CB2B that is expressed higher in other peripheral tissues than CB2A. Species comparison found that the CB2 gene of human, rat and mouse genomes deviated in their gene structures and isoform expression patterns. mCB2A expression was increased significantly in the cerebellum of mice treated with the CB-R mixed agonist, WIN55212-2. These results provide much improved information about CB2 gene structure and its human and rodent variants that should be considered in developing CB2-R-based therapeutic agents.

Keywords: Brain, CB2 cannabinoid receptors, CB2A, CB2B, spleen, testis

Received 3 February 2009, revised 28 March 2009, accepted for publication 15 April 2009

Marijuana remains one of the most widely used drugs, and much progress in cannabinoid research has showed the existence of an elaborate endocannabinoid physiological control system (EPCS) in animals and humans (Mackie 2008; Onaivi *et al.* 2008), with increasing new knowledge on the scientific and therapeutic bases for the use of cannabinoids (CBs) as medicine. The EPCS consists of (1) cannabinoid receptors (CB-Rs), (2) endogenous compounds termed endocannabinoids (eCBs) that activate these receptors and (3) enzymes that synthesize and degrade the eCBs. The study of the distribution and function of various components of the EPCS in the brain has provided the basis for the established effects of marijuana and eCBs. Thus, the use of cannabis or administration of phytocannabinoids or synthetic CBs interacts with the EPCS to modulate synaptic transmission. This modulatory action on synaptic transmission has significant functional implications on the interactions between exogenous cannabinoids such as smoking marijuana or administration of Δ^9 -THC and eCBs-mediated synaptic plasticity.

The expression of CB1 cannabinoid receptors (CB1-Rs) in the brain and periphery has been well studied, but CB2-Rs have received much less attention than have CB1-Rs (Mackie 2008; Onaivi *et al.* 2006). Both CB1-Rs and CB2-Rs are widely distributed in peripheral tissues with CB2-Rs particularly enriched in immune tissues and cells such as spleen, thymus and leucocytes (Sugiura & Waku 2002). The functional neuronal expression of CB2-Rs in the brain had therefore been ambiguous and controversial (Onaivi *et al.* 2006; Van Sickle *et al.* 2005). The lack of CB2 information on brain expression is because CB2-Rs were thought previously to be expressed primarily in some peripheral tissues such as the spleen and in other immune cells and has therefore been traditionally referred to as the peripheral CB-Rs (Gerard *et al.* 1990; Griffin *et al.* 1999; Munro *et al.* 1993). Several studies have now identified and characterized glial and neuronal CB2-Rs in the central nervous system (CNS). However, many features of CB2-R gene structure, regulation and variation remain poorly characterized (Benito *et al.* 2008; Gong *et al.* 2006; Nunez *et al.* 2008; Onaivi *et al.* 2006; Van Sickle *et al.* 2005). This poor characterization

of CB2-R gene structure and polymorphisms hampers progress in the determination of the functional role of CB2-Rs, particularly in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. Furthermore, the neurobiological basis for CB2-R physiological activity, and its putative interaction with or without CB1-Rs remains to be determined.

Our recent studies indicate that genetic variants of CB2 gene expression, with a high incidence of Q63R but not the H316Y polymorphism, is involved in eating disorders, substance abuse and depression in a human population (Onaivi *et al.* 2008). Other studies in human tissue samples from participants with Alzheimer's disease showed that CB2-Rs are selectively over expressed in the microglial cells that are associated with A β -enriched neuritic plaques (Pazos *et al.* 2004). Data obtained *in vitro* and from animal models showed the inducible nature of CB2-Rs under neuroinflammatory conditions and suggest that the upregulation of CB2-Rs is a common pattern of response against different types of chronic human brain neuropathology (Benito *et al.* 2008). Accruing evidence shows that CB2-Rs and its gene variants may play possible roles in neuroinflammation occurring in multiple sclerosis, traumatic brain injury, HIV-induced encephalitis, Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases (Benito *et al.* 2008). It would be important to understand the role of CB2-Rs and its gene variants in disturbances of the brain involving neuroinflammation. Therefore, improved information about the CB2 gene and its human variants might add to our understanding of the role of CB2-Rs during neuroinflammatory conditions in the CNS and beyond immunocannabinoid activity.

To date, the complete gene structure, 5'- and 3'-UTR, and transcription initiation sites of human CB2 receptor have not been fully characterized (Abood 2005; Onaivi *et al.* 2006). Because the identification of mouse CB2 expression in brain regions was reported (Gong *et al.* 2006; Van Sickle *et al.* 2005), the specific expression of human or mouse CB2 isoforms in brain regions was not known. However, the published evidence showed significant species differences of CB2-Rs in human, mouse and rat in terms of peptides, mRNA sizes, gene structure and pharmacology (Brown *et al.* 2002; Munro *et al.* 1993; Shire *et al.* 1996). We thereafter name human, mouse and rat CB2 genes as hCB2, mCB2 and rCB2, respectively. For instance, hCB2 mRNA was detected in the HL60 cell line (human acute promyelocytic leukemia cells) by Northern blot as 2.5-kb and 5.0-kb mRNA bands that were elevated by TPA- (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) and DMF- (*N,N*-dimethylformamide) induced differentiation to myeloid and granulocyte, respectively (Munro *et al.* 1993). The mRNA 5.0-kb and 2.5-kb bands of hCB2 were also observed in the Jurkat E6-1 cell line (human T-cell leukemia cells); however, only the 2.5-kb band was observed in human peripheral blood acute leukemia cell line (HPB-ALL) cells (Schatz *et al.* 1997). In contrast, mCB2 mRNA were shown to be predominantly expressed as a single band of 4.0 kb in spleen (Schatz *et al.* 1997). Different rCB2 mRNA species

were observed as a 2.4-kb band (Schatz *et al.* 1997) and as a 3.9-kb band in rat spleen, thymus, testis and leucocytes (Brown *et al.* 2002). The discrepancies on CB2 mRNA sizes in the literature indicated incomplete gene structure of CB2 gene in different species or polymorphism in the same species. We now report on the discovery of a novel CB2 gene promoter that differentially encodes tissue-specific CB2 gene expression in human tissues. Intriguingly, the testis-specific isoform hCB2A expression level was much higher in brain regions than the spleen-dominant hCB2B isoform that is expressed at higher levels in spleen and other peripheral tissues except testis. Our results showed tissue-specific isoforms of *CNR2* gene that may provide tissue-specific targeting of cannabinoids in inflammatory and neuropathic pain disorders associated with CB2-Rs in the brain and peripheral tissues.

Materials and methods

RNA isolation, complementary DNA synthesis and real-time polymerase chain reaction quantification

Human total RNA from brain and peripheral tissues were obtained from Clontech (Mountain View, CA, USA) and human brain tissues were obtained from the NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders at the University of Maryland. Mouse total RNAs were extracted from C57BL/6J, C57BL/10J and the BTBR T+tf/J mouse peripheral tissues and brain regions using RNeasy protocol (Qiagen, Crawfordsville, IN, USA). Single strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Novel hCB2A exons (exons 1a and 1b) were identified by aligning human genomic sequences with expressed sequence tag clone AL527378 isolated 3'-from normalized neuroblastoma cDNA library. For quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assays, the exon-specific primers and fluorescent FAM-labeled and minor groove binder (MGB) conjugated probes of hCB2, mCB2 and rCB2 genes were designed (Table 1) using Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For hCB2 expression study, an hCB2A-specific probe was designed to span exons 1a and 1b, and an hCB2B-specific probe was designed to span exons 2 and 3. For the mCB2 expression study, a mCB2A-specific probe was designed to span exons 1 and 3 and a mCB2B-specific probe was designed to span exons 2 and 3. For the rCB2 expression study, specific probes (Table 1) were designed to span exons 1 and 3 and exons 2 and 3 to detect rCB2A and rCB2B expression, respectively. The rCB2 primers were also designed (Table 1) to detect retroposon B2 insertion into 3'UTR of rCB2.

Endogenous controls were provided by predeveloped human *GAPDH* or mouse and β -actin with fluorescent FAM-labeling (Applied Biosystems). ABI 7900HT Sequence Detection System default program was used for RT-PCR with 40 cycles as well as rCB2 B2 insertion detection.

The novel isoforms were confirmed by agarose gel analysis of PCR fragments that were in the expected sizes and by dideoxynucleotide sequencing. To confirm hCB2A testis-specific expression, TaqMan assays were carried out independently by different individuals. Mouse mCB2 gene expression and regulation by treatment with cannabinoids were determined in mouse brain regions and other peripheral tissues after subacute treatment with CB-R ligands in comparison with vehicle-treated control mice. Sprague-Dawley and Long Evans rats were decapitated, and the brain and peripheral tissues were dissected for RNA isolation and cDNA synthesis. The different brain regions included striatum, brain stem, cerebellum, hypothalamus and frontal cortex, and peripheral tissues included spleen and testis.

Table 1: TaqMan probes and flanking forward and reverse primer sequences for human, mouse, and rat CB2 genes and PCR primers to amplify rat B2 insertion site

Isoforms	Exons	MGB TaqMan probes	Forward primer	Reverse primer
hCB2A	Exons 1a, 1b	CCAGATGCAGCCGC	GGAAGAAAGAGAATATTGTTTCAGTTGATT	GCTGGCCTTGAGAGTGCACA
hCB2B	Exons 2, 3	ACAACACAACCCAAAGC	TGGGAGAGGACAGAAAACAACG	TGGGCCCTTCAGATTCCA
rCB2A	Exons 1, 3	CTGACAAATGACACCCAGTC	CAGGACAAGGCTCCACAAGAC	GATGGGCTTTGGCTTCTTCTAC
rCB2B	Exons 1, 3	TGGGCCCAGTCTT	GCCACCCAGCAAACATCTCT	GATGGGCTTTGGCTTCTTCTAC
rB2 insert	Exon 3		CCAGGCTGCTCCAATTGCT	TCTGACTCGGACTGCTTCCA
mCB2A	Exons 1, 3	CTGACAAATGACTCCAGTC	CAGGACAAGGCTTCACAAGAC	GACAGGCTTTGGCTGCTTCTAC
mCB2B	Exons 2, 3	TGGGCCCAGTCCT	GCCACCCAGCAAACATCTAT	GACAGGCTTTGGCTGCTTCTAC
mCB2-KO	Exon 3	ATGCTGGTTCCTGCAC	AGCTCGGATGCGGCTAGAC	AGGCTGTGGCCCATGAGA

Animal subjects and cannabinoid receptor ligand treatments

Animals (males) from the selected mouse strain C57BL/6Js were treated daily for 7 days with the mixed cannabinoid agonist, WIN55212–2 (2 mg/kg). On test days, animals were treated with the test drug for 30 min before assessment of the performance of the mice in forced swim test (FST) for 5 min. In this study, the effect of WIN55212–2 acutely and on day 6 in the FST was determined and compared with control mice following 7 days of daily administration. Six mice per group were killed, and non-injected BTBR mice tissue parts included for mCB2 gene expression analysis were as follows: vehicle = (V1–V6), WIN55212–2 (2 mg/kg) = (W1–W6) and untreated BTBR = (B1–B6). We also analyzed mCB2 gene expression in chronically treated C57BL/10Js treated with CB1-R antagonist (AM 251, 3 mg/kg) or CB2-R antagonist (AM 630, 10 mg/kg) in comparison with vehicle-treated control mice.

The mCB2 knockout mice were bred at NIDA-IRP from two CB2^{+/–} breeding pairs, generously donated by Dr George Kunos at the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). Genotyping was performed by the Charles River National Laboratories. We analyzed mCB2 expression in brain regions, testis and spleen using the three TaqMan probes against two promoters of mouse mCB2 gene and the deleted part of mCB2 gene (Table 1).

Statistical analysis

Prism-3 program, version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used for graphical and statistical analyses including *t*-tests and one-way analyses of variance. The accepted level of significance is *P* < 0.05.

Results

Human CB2 genomic structure (1p36.1) and discovery of a novel hCB2A promoter

With the published evidence showing clear species differences of CB2-Rs in human, mouse and rat in terms of mRNA sizes in tissues and cell lines (Brown *et al.* 2002; Munro *et al.* 1993; Shire *et al.* 1996), we set out to identify unidentified human hCB2 isoforms by first aligning the EST sequences with hCB2 genomic sequences and then by PCR amplification. We found that an EST clone (AL527378) derived from a normalized neuroblastoma cDNA library aligned with two upstream human hCB2 exons (exons 1a and 1b) and downstream major coding exon (exon 3) with two conserved exon–intron (AG-GT) junctions (Fig. 1a). We then sequenced the PCR fragments that were amplified using

primers designed according to the novel exons, and we deposited hCB2A cDNA sequence in GenBank (EU517121). The novel exons 1a and 1b of hCB2 are located at 85 478 bp and 75 971 bp, respectively, upstream from the major coding exon 3. Both of the novel exons 1a and 1b are 5'UTR sequences because they do not contain open reading frame in frame with the initiation methionine of hCB2 encoded by the exon 3. In contrast, the previously identified upstream 5'UTR exon 2 is located 39 769 bp upstream from the major coding exon 3 (Munro *et al.* 1993). Therefore, the size of the newly identified hCB2A isoform spans a genomic region of 90.8 kb, about twice as large as the previously identified human hCB2B gene of 45.7 kb (Fig. 1a).

There are four probable poly A signals and poly A sites in the extended 3'UTR sequence of hCB2 cDNA. The first poly A site is the previously identified cDNA clone (HCX5.36) with imperfect polyadenylation signal sequence of GATAAA (Munro *et al.* 1993). There are three additional poly A sites with perfect polyadenylation signal sequence AATAAA; the second poly A site is located at 2799 bp of hCB2A (EU517121) with poly A containing 3'EST alignments (AW515513, AI864752 and AI475798). The third is located at 4632 bp with poly A containing 3'EST alignments (AW967543, AW966929, AV715015 and AA250845), and the fourth is located at 5349 bp with polyA containing 3'EST alignments (AW405600, AW294847, AA909480, AI218261 and AI424994). All these 3'EST clones were derived from cDNA libraries of B cells or lymphocytes. The additional evidence of hCB2 mRNA that contains extended 3'UTR sequence is another hCB2 cDNA clone (HCX5.1) with extended sequence beyond the first polyA site (Munro *et al.* 1993). Therefore, human *CNR2* gene contains two separate promoters and several alternative polyA sites, generating multiple mRNA sizes as previously observed in Northern blot of human HL-60 and Jurkat E6-1 cell lines (Munro *et al.* 1993; Schatz *et al.* 1997). The first promoter initiates from 5'UTR exon 1a and is spliced to exon 1b and then to the major coding exon 3 (Fig. 1). The second promoter initiates from exon 2 that is also spliced to the major coding exon 3 (Fig. 1). We named the novel hCB2 isoform that is transcribed from the first exon as hCB2A and the second promoter as hCB2B.

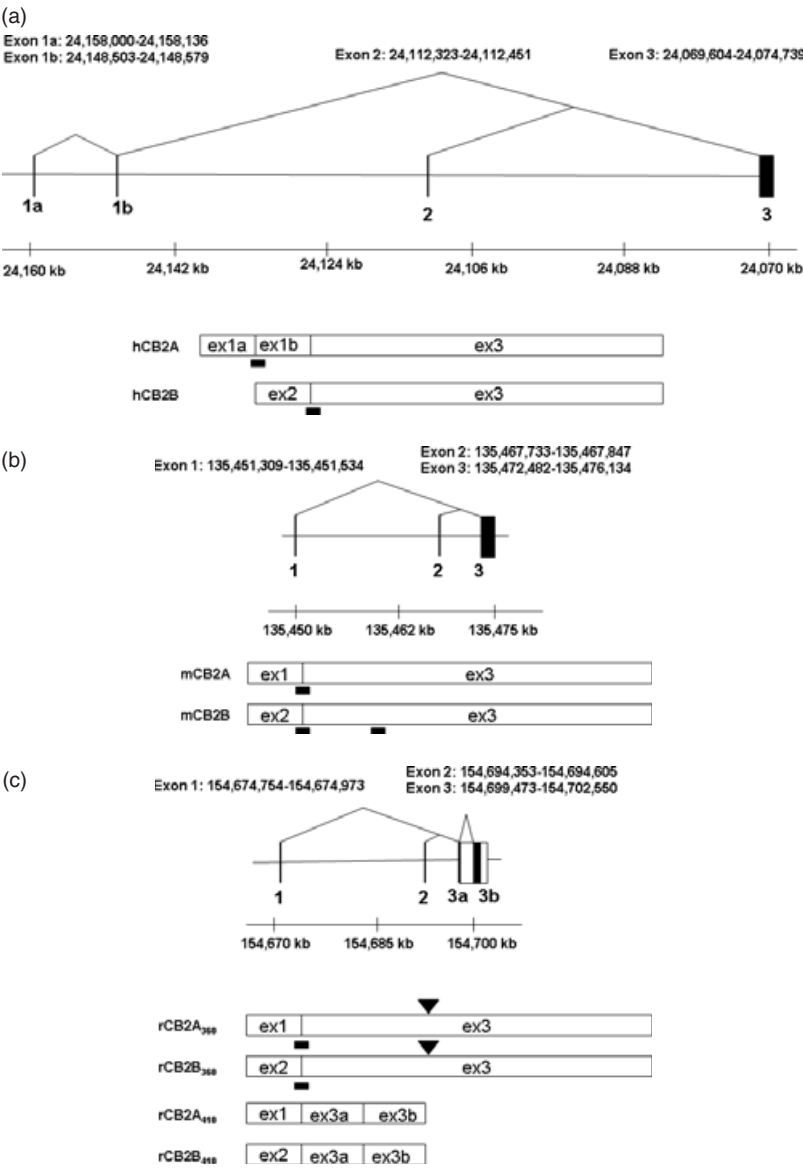


Figure 1: (a) Human hCB2 genomic structure and transcripts. (b) Mouse mCB2 genomic structure and transcripts. (c) Rat rCB2 genomic structure and transcripts. Horizontal line represents NCBI MapViewer's *Homo sapiens* chromosome1p36.1 position Build 36.3, *mus musculus* chromosome 4D3 position Build 37.1, and *Rattus norvegicus* chromosome 5q36 position Build RGSC 34.1. Vertical bars represent exons. Triangular lines represent splicing events. Open boxes represent spliced exons in mRNA transcripts. Black bars represent the location of TaqMan probes. Black boxes represent intraexonal splicing of rat rCB2 major coding exon and black triangles represent rat B2 retroposon insertions sites.

Human hCB2A and hCB2B isoform tissue expression patterns

We next tested the tissue expression patterns of the newly identified hCB2A isoform in comparison with the previously identified hCB2B isoform in various human peripheral tissues and brain regions. The tissue cDNA templates were synthesized from human RNA preparations that consist of intact RNA with no genomic DNA contamination (Clontech). The TaqMan probes were designed across exon 1a/1b and exon 2/3, respectively, for detecting specific hCB2A and hCB2B isoform expression and avoiding the detection of genomic contamination (Table 1 and Fig. 1a). Strikingly, hCB2A expression was observed predominantly in testis, i.e. more than 100-fold than that of spleen and leucocytes. The hCB2A expression was also observed in various brain regions

at levels, i.e. zero to twofold using intestine hCB2A as a reference (Fig. 2a). As expected, hCB2B expression was observed predominantly in spleen and leucocytes. Spleen and leucocytes hCB2B mRNA levels were 120- and 30-fold higher than that of intestine reference of hCB2B (Fig. 2b), respectively. However, there was little expression of hCB2B in brain regions. In comparison with intestine hCB2B reference, hCB2A expression levels were significantly lower in peripheral tissues except in testis; however, hCB2A expression in brain regions was observed in amygdala, caudate, putamen, nucleus accumbens, cortex, hippocampus and cerebellum at low levels. The caudate hCB2A mRNA level was about 0.07% of the spleen hCB2B expression level (Fig. 2c). This is the first observation of the isoforms-specific expression of human hCB2A at significant, albeit low levels (<1% of hCB2A

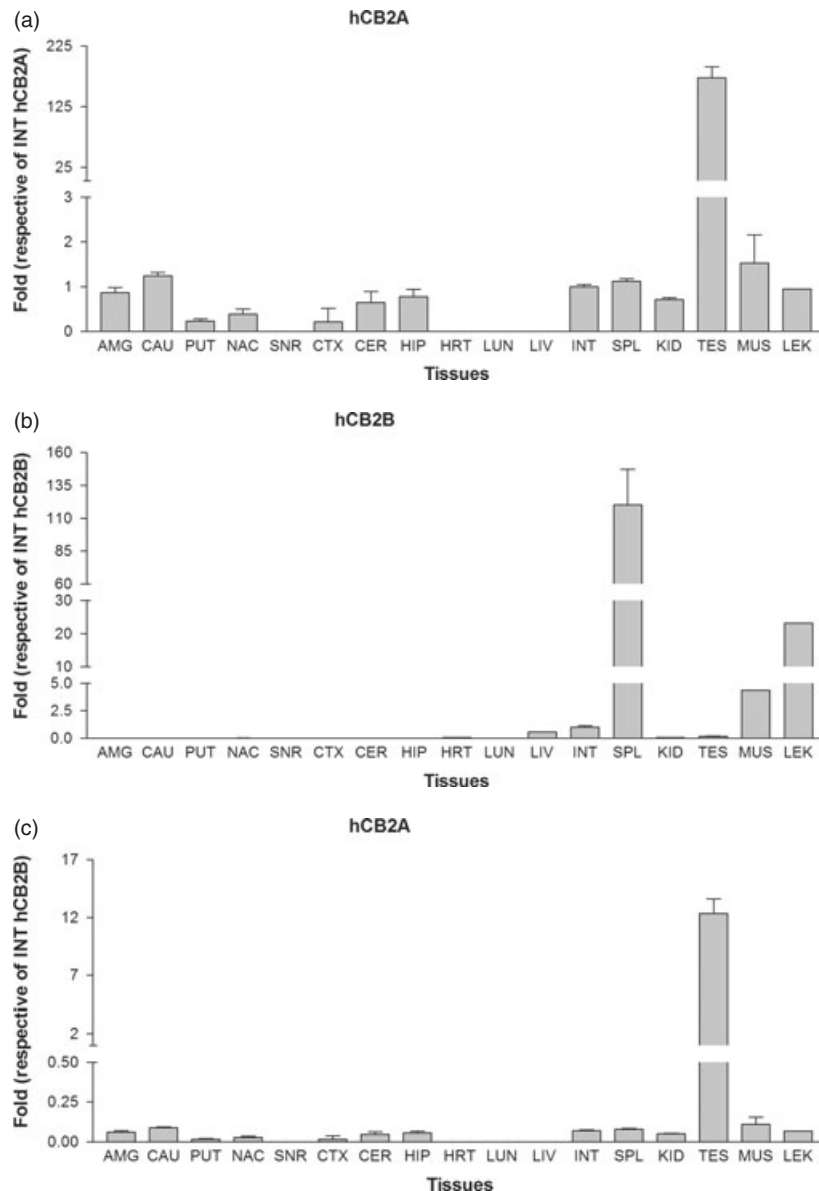


Figure 2: Tissue expression patterns of human hCB2A and hCB2B isoforms.

(a) Human hCB2A isoform expression in different brain regions and peripheral tissues using human intestine hCB2A as a reference. (b) Human hCB2B isoform expression in different brain regions and peripheral tissues using human intestine hCB2B as a reference. (c) Human hCB2A isoform expression patterns using human intestine hCB2B as a reference. Error bars were derived from standard deviation (SD) of triplicate TaqMan assay. The abbreviations for brain regions and peripheral tissues are AMG, amygdala; CAU, caudate; PUT, putamen; NAC, nucleus accumbens; SNR, substantia nigra; CTX, cortex; CER, cerebellum; HIP, hippocampus; HRT, heart; LUN, lung; LIV, liver; INT, intestine; SPL, spleen; KID, kidney; TES, testis; MUS, muscle; LEU, leucocytes.

testis expression and <0.1% of CB2B spleen expression) in human brain regions (Fig. 2c).

Mouse mCB2 genomic structure (4D3) and tissue expression patterns

Mouse mCB2 gene contains three exons with two separate promoters (Fig. 1b) (Onaivi *et al.* 2006). Transcription of the first cloned mouse mCB2A cDNA (X86405) was initiated from the first exon (Shire *et al.* 1996) and that of the mouse mCB2B cDNA clones from FANTOM Consortium and Mammalian Gene Collection (AK036658 and BC024052, respectively) was initiated from exon 2 (Fig. 1b) (Okazaki *et al.* 2002; Strausberg *et al.* 2002). However, the tissue

expression patterns of the specific mCB2A and mCB2B isoforms were not known. We designed the isoform-specific TaqMan probes across exon 1/3 and exon 2/3 (Table 1 and Fig. 1b) to determine mCB2A and mCB2B tissue expression patterns, respectively. Mouse mCB2A and mCB2B were expressed predominantly in spleen, although the mCB2A and mCB2B isoform transcripts were also detected in brain regions such as frontal cortex, striatum and brain stem at about 1% of the spleen expression (Fig. 3a,b). Although mCB2A and mCB2B tissue expression patterns were similar, mCB2A mRNA levels were generally about fivefold higher than mCB2B using brain stem CB2A as a reference (Fig. 3c); therefore, mouse mCB2A isoform is expressed at higher levels than mCB2B in brain regions and other peripheral tissues.

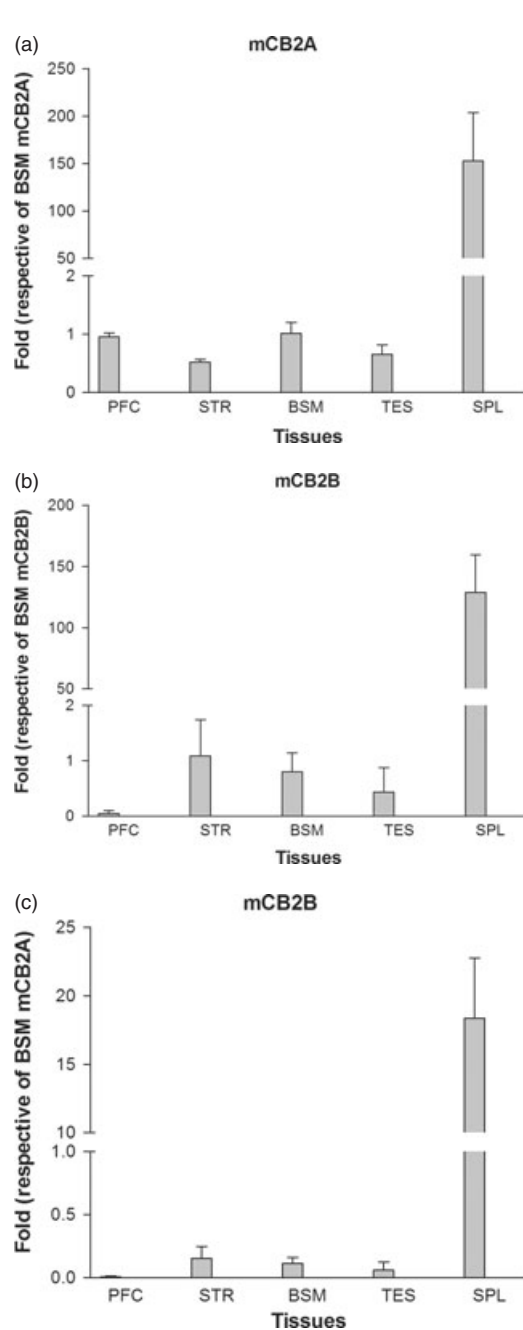


Figure 3: Tissue expression patterns of mouse mCB2A and mCB2B isoforms. Error bars were derived from standard error of means (SEM) from six mice. (a) Mouse mCB2A isoform expression in different brain regions and peripheral tissues using mouse brain stem mCB2A as a reference. (b) Mouse mCB2B isoform expression in different brain regions and peripheral tissues using mouse brain stem mCB2B as a reference. (c) mCB2A isoform expression patterns using mouse brain stem mCB2A as a reference. The abbreviations for brain regions and peripheral tissues are PFC, prefrontal cortex; STR, striatum; BSM, brain stem; TES, testis; SPL, spleen.

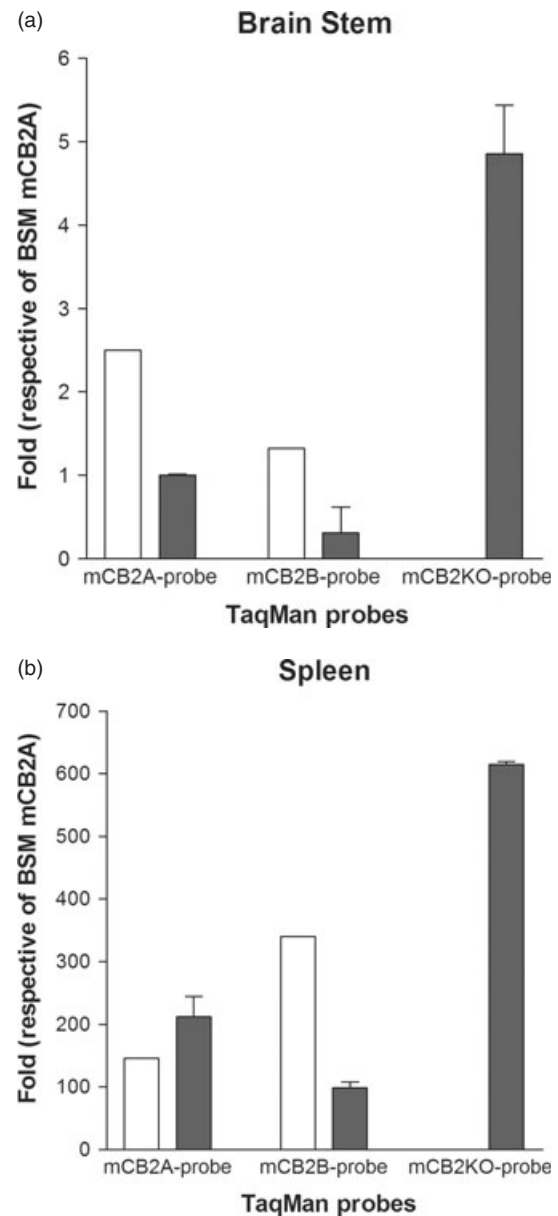


Figure 4: Detection of mCB2 tissue expression in the C-terminus deletion of mCB2 knockout mouse (open bars) and wild type (filled bars) by mCB2A, mCB2B and mCB2-KO TaqMan probes. Figures (a) and (b) represent brain stem (BSM) and spleen (SPL), respectively.

Upregulation of undeleted portion of mCB2 in the C-terminal knockout mouse tissues

We further investigated the promoter activities of mCB2A and mCB2B in the knockout mouse brain and peripheral tissues, because the knockout strain deleted the C-terminal 131 amino acid including last two transmembrane and intracellular domains (Buckley 2008; Buckley *et al.* 2000). We found that there was a compensatory effect of mCB2A


```

Human CB2      300 ALRSGEIRSSAHHCLAHWKKCVRLGSEAKEEAPRSSVTETeadgKITPWPDSRDLDLSDC 360
Chimp CB2      300 ALRSGEIRSSAHHCLAHWKKCVRLGSEAKEEAPRSSVTETeadgKITPWPDSRDLDLSDC 360
Monkey CB2     300 ALRSGEIRSSAHHCLAHWKKCVRLGSEAKEEAPRSSVTETeadgKITPWPDSRDLDHSSC 360
Bovine CB2     300 ALRSGEIRSSAHHCLAHWKKCVRLGSEAKEEAPRSSVTETeadgKITPWPDSRDLDHSSC 360
Dog CB2        300 ALRSGEIRSSAFHCLAHWRRHLRLGLEGNKEVPRSSVTETeadgKITPWPDSRVLNCPCD 360
Rat CB2360     300 ALRSGEIRSAQHCLTGWKYLLQGLGSEGKEEAPKSSVTETEAevKITTPGSRTPGCSNC 360
Rat CB2410    300 ALRSGEIRSAQHCLTGWKYLLQGLGSEGKEEAPKSSVTETEAETLVLDKQELGGDCLLR 360
Mouse CB2      300 ALRSGEIRSAQHCLIGWKYLLQGLGPEGKEEGRSSVTETeadVKTT----- 347
                *****:* * * *::: ** *.: * *:*****:
Rat CB2410    361 TSSIHPMLSLADSANRQDVRPHCPBELTWCSVRRPISLPNKAGQSTLL 410

```

and mCB2B promoter activities that upregulate mCB2A and mCB2B isoforms in the brain stem of mCB2 knockout mouse (Fig. 4a) using wild-type brain stem mCB2A as a reference. The expression level of mCB2B was also upregulated, although mCB2A expression was reduced in the spleen tissue of mCB2 knockout mice (Fig. 4b). We further designed the TaqMan probe mCB2-KO (Table 1) that hybridized to the deleted C-terminus of mCB2 knockout mouse (Buckley *et al.* 2000) to validate the mCB2 expression in the mCB2 knockout mouse. We found that the knockout mouse did not express the deleted portion of mCB2 in the brain stem and spleen; however, the mCB2-KO TaqMan probe could readily detect the C-terminal expression in the brain stem and spleen tissue of the wild-type mouse (Fig. 4a,b).

Rat rCB2 genomic structure (5q36) and novel isoforms without retroposon B2 insertion at 3' UTR

Rat rCB2 gene was reported previously to contain three coding exons that encode two different intracellular C-terminal peptides with one homologous (Griffin *et al.* 2000) and the other non-homologous with hCB2 and mCB2 C-terminal peptides (Brown *et al.* 2002). The upstream promoters of rCB2 gene were not reported in the literature. In order to identify rCB2 isoforms by PCR cloning, we used homologous region of mouse exons 1 and 2 for forward primers and used downstream exon 3 sequence for the reverse primers (Table 1 and Fig. 1c). We found that rCB2 gene also contains isoform rCB2A and rCB2B that were transcribed from upstream promoters of exons 1 and 2, respectively, similar to mCB2 gene (Fig. 1c). The rCB2 genomic region of 29 kb is also significantly shorter than that of the hCB2 gene of 90 kb. Surprisingly, we found only one coding exon instead of three coding exons (Brown *et al.* 2002) in Sprague–Dawley and Long Evans rat cDNA templates synthesized from spleen and brain regions (Fig. 1c). The uninterrupted coding exon encodes rCB2 of 360 amino acids with shorter intracellular C-terminal peptide (Fig. 5) as Griffin *et al.* reported (Griffin *et al.* 2000) than that of previously cloned rCB2 of 410 amino acids (Brown *et al.* 2002). We named the rat C-terminal isoform as rCB2₃₆₀ and rCB2₄₁₀ for rCB2 isoforms containing 360 and 410 amino

Figure 5: Alignment of the C-terminal intracellular peptide sequences of CB2 receptors from human, mouse, rat rCB2₃₆₀ and rCB2₄₁₀ isoforms. The numbers represent the amino acid numbers in each of the CB2 receptors from different species and isoforms. Asterisks represent identical amino acids; colons and dots represent similar amino acids. Bold and underlined S represents predicted PKA phosphorylation and PKC phosphorylation sites (Score >0.65, NetPhosK 1.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>).

acids, respectively. Interestingly, rCB2₃₆₀ isoform contains the same size of hCB2 intracellular C-terminal peptide with 67% identity and is 13 amino acids longer than that of mCB2 intracellular C-terminal region with 72% identity (Fig. 5). We could not detect rCB2₄₁₀ in the rat strains of Sprague–Dawley and Long Evans that were used for the experiment; therefore, we could not compare the expression levels of rCB2₃₆₀ and rCB2₄₁₀ isoforms. The tissue expression patterns of rCB2A and rCB2B were very similar with mCB2A and mCB2B (data not shown; primer sequences are listed in Table 1).

There is a rat B2 retroposon insertion (flanked by direct repeat) into the 3'UTR region of the major coding exon in the reported rat rCB2 cDNA clone (Brown *et al.* 2002) as well as the NCBI rat genomic sequence. Using primers that flank the B2 retroposon insertion site (Table 1), we showed that the Sprague–Dawley and Long Evans rats that we used did not contain B2 retroposon insertion (data not shown). Indeed, Celera rat genome sequence does not contain the B2 retroposon insertion of the major coding exon of rCB2 gene.

Species differences of CB2 gene among human, mouse and rat

Including the newly identified exons of hCB2A, the human *CNR2* gene spans the 90-kb genomic region, which is about four times larger than the 23-kb mouse mCB2 gene and 29-kb rat rCB2 gene (Fig. 1a–c), respectively. Using the default setting of NCBI Blast 2 program to align human and rodent exon sequences, the only region that aligns significantly is in the protein coding region and no significant alignments could be found in the 5'UTR and 3'UTR sequences between human and rodent rCB2 and mCB2 cDNA sequences. The full length of human hCB2 3'UTR sequence is 2500 and 3000 bp longer than that of mouse and rat 3'UTR sequences, respectively. In contrast, mouse and rat 5'UTR and 3'UTR were well aligned with more than 85% identity. However, mCB2 contains longer 3'UTR (779 bp longer) than that of rCB2. Mouse mCB2 contains a stop codon that precedes the C-terminal 13 amino acids of human hCB2 and rat rCB2 isoforms, although the remaining 12 amino acids of mCB2 after stop codon are completely identical to rCB2₃₆₀ isoform. It is possible that a nonsense mutation occurred during mouse

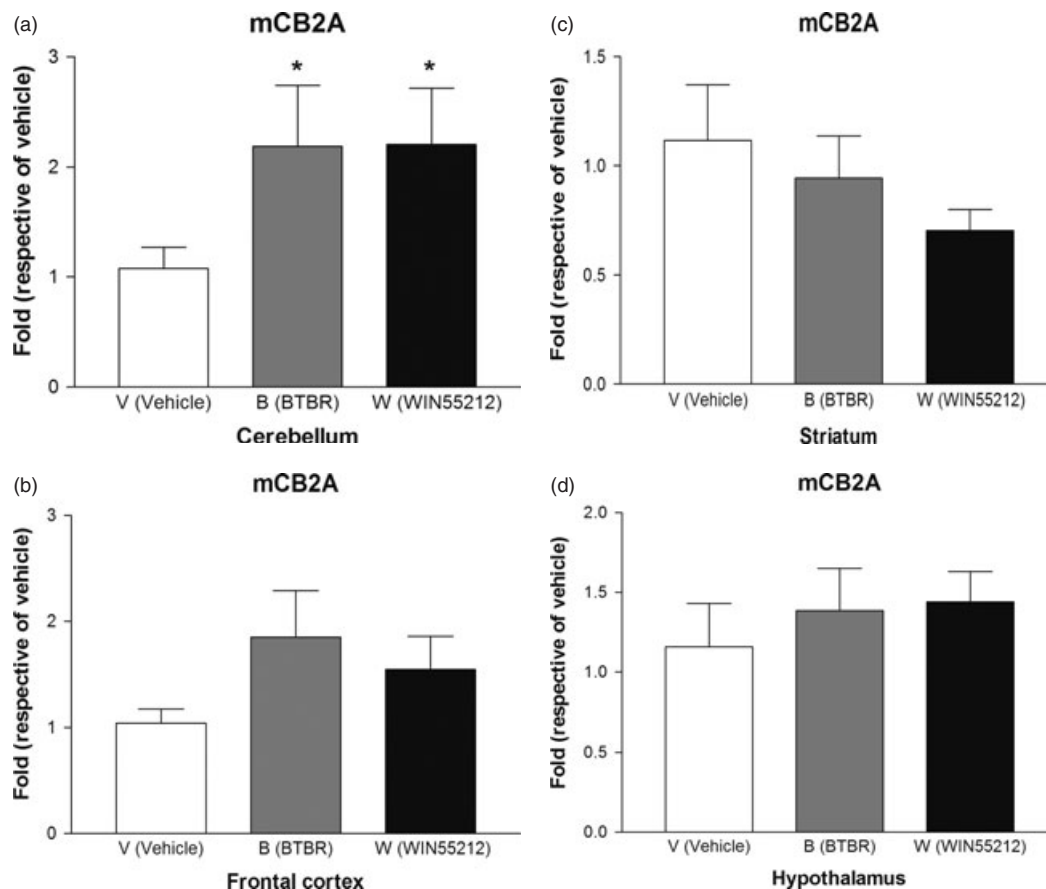


Figure 6: Regulation of mCB2A after 7 days of subacute treatment with the mixed CB-R agonist WIN55212-2 in different brain regions of mice from the inbred strain C57BL/6J and in untreated animals from the BTBR T+tf/J mouse autism model. Error bars were derived from standard error of means (SEM) from six mice. (a) Cerebellum, (b) frontal cortex, (c) striatum and (d) hypothalamus. B (BTBR) mice were untreated whereas W (C57BL/6J) treated animals with WIN55212) had similar upregulation of CB2A gene.

evolution because all other mammalian species such as rat, bovine, sheep, dog, rhesus monkey and chimpanzee do not contain the premature stop codon as does mouse mCB2 (Fig. 5).

Although human and mouse CB2 genes both contain two promoters, the 5' flanking sequences of the transcription initiation exons share no significant homology and the promoter activities of hCB2 and mCB2 genes are quite different. Human hCB2A is expressed predominantly in testis and hCB2B predominantly in spleen, whereas both rodent CB2A and CB2B are expressed predominantly in spleen. Human hCB2A promoter transcription is stronger in testis and brain regions, whereas hCB2B promoter transcription is stronger in spleen, leucocytes and other peripheral tissues (Fig. 2a–c). In contrast, mouse mCB2A promoter activity is about five times stronger in the expressed tissues than that of mCB2B (Fig. 3a–c). The common features of human and rodent CB2 tissue expression patterns are the isoform-specific predominant tissue expression such as human hCB2A in testis, human hCB2B in spleen, and rodent mCB2A

and mCB2B in spleen (Figs 2 and 3). The detectable brain expression of hCB2A was at very low levels at 1% of that of hCB2A in testis and 0.07% of that of hCB2B in spleen; however, the detectable brain expression of mCB2A was measurable at 1% of that of mCB2A in spleen. Therefore, CB2A isoform expression is higher in mouse brain than in human brain. In general, human hCB2B expression levels were higher than hCB2A except in testis and brain regions. Mouse mCB2A expression levels were generally higher in both brain and peripheral tissues. The gene regulation mechanisms might differ in human and mouse CB2 genes.

Regulation of mCB2 isoform expression by CB-R ligand treatment in mouse brain regions of C57BL/6J mice, similar to untreated autistic mouse model of BTBR T+tf/J strain

Are mice mCB2A and mCB2B receptor isoforms regulated differentially by treatment with the mixed cannabinoid agonist and CB2-R ligands? We therefore determined

mCB2 gene expression in mice brain regions after subacute treatment with CB2-R ligands using CB1-R selective antagonist AM251 (3 mg/kg) and CB2-R selective antagonist AM 630 (10 mg/kg) and the mixed cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 (2 mg/kg) after 4 weeks of treatment (Fig. 6). We did not observe any significant changes of mCB2A and mCB2B in peripheral tissues such as spleen and testis (data not shown). We did not observe any significant expression changes in AM251 and AM630 treatment for CB1- and CB2-specific antagonist treatments, respectively, in brain regions (data not shown). However, there were mouse strain and brain regional-specific mCB2 gene expression profiles following subacute administration with the mixed cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 (2 mg/kg). In the cerebellum, for example, mCB2A was significantly (t -test: $t = 2.39$, $df = 10$, $P = 0.0438$) upregulated by treatment of C57BL/6J mice with WIN55212-2 in comparison with vehicle controls. Interestingly, mCB2A was also increased significantly in the cerebellum of the BTBR T+tf/J strain of mouse compared with C57BL/6J strain (Fig. 6a). mCB2A isoform expression was increased about onefold in cerebellum in the mixed agonist WIN55212-2 treatment, although no significant changes were observed in other brain regions such as frontal cortex, striatum and hypothalamus (Fig. 6b–d). mCB2B regulation in mouse brain regions were not shown because mCB2B expression is several times lower than that of mCB2A, and the mRNA levels could not be measured reliably by TaqMan assay.

Discussion

New data obtained from these studies shed some light on the ambiguity and sometimes confusing structure and expression patterns of CB2/*CNR2* gene in different species (Brown *et al.* 2002; Munro *et al.* 1993; Shire *et al.* 1996). Using isoform-specific TaqMan probes, we have identified a novel human hCB2A isoform that is expressed predominantly in testis and at lower levels in brain regions of reward system in contrast to hCB2B that is expressed predominantly in spleen with very low expression in brain. We showed that the different sizes (2.5 and 5.0 kb) of hCB2 mRNA observed in Northern blot (Munro *et al.* 1993; Schatz *et al.* 1997) were because of alternative polyadenylation of the extended 3'UTR of hCB2 mRNA. Mouse mCB2A and mCB2B are both expressed predominantly in spleen with mCB2A expression about five times higher in the expressed tissues. mCB2 knockout strain with the C-terminal deletion (Buckley *et al.* 2000) showed enhanced mCB2A and mCB2B promoter activities that might reflect increased expression of the truncated mCB2 receptor. The N-terminal-specific antibody against mCB2 shall be used in the future experiment to determine whether the truncated mCB2 protein is indeed upregulated. The truncated mCB2 receptor might introduce gain of function and influence interpretation of pharmacological and behavioral experiment results on mCB2 knockout mice.

We also identified a rat rCB2₃₆₀ short isoform (Griffin *et al.* 2000) that contains a shorter intracellular C-terminus peptide than previously identified rat rCB2₄₁₀ long isoform (Brown *et al.* 2002). The rCB2₃₆₀ C-terminus intracellular region is more homologous to human and mouse mCB2 C-terminal peptide than that of rCB2₄₁₀ isoform. It is possible that the B2 retroposon insertion into the 3'UTR of rCB2 alters the splicing pattern and created two cryptic alternative splicing sites that caused a frame shift and generated different intracellular C-terminal sequence of rCB2 protein, which also was shown by different sizes of rCB2 mRNA on Northern blot (Brown *et al.* 2002). Subsequently, Brown *et al.* (2002) noted a G-to-T transversion following codon 343 of rCB2 might introduce a putative GT splice donor site that initiates an intron. However, Ashton *et al.* found that the 54 nucleotides following the G-to-T transversion share high identity with homologous hCB2 cDNA sequence including the stop codon (Ashton *et al.* 2008). However, another cDNA sequence (AF286722) from the same laboratory (Brown *et al.* 2002) contains upstream exon 1 spliced to the uninterrupted exon 3 of the rCB2 with B2 retroposon insertion sequence. Translation of this uninterrupted rCB2A sequence produced the same C-terminal intracellular peptide sequence as did rCB2₃₆₀. It is very likely that the major rCB2 isoform is rCB2₃₆₀. We could not find G-to-T transversion or the B2 insertion in the rat strains that we used for the experiment. The expression levels of rCB2₃₆₀ and rCB2₄₁₀ isoforms, and the 3'UTR with or without B2 insertion, therefore, could not be measured. It would be interesting to use proteomic approach to identify rCB2₃₆₀ and rCB2₄₁₀ isoforms once the G-to-T transversion and B2 insertion are identified in rat strains. The C-terminal intracellular domain of CB2 interacts with Gi/o protein that is negatively coupled with adenylyl cyclase (Bayewitch *et al.* 1995) and activates the MAP kinase signal transduction pathway (Wartmann *et al.* 1995). The differences in rat rCB2₃₆₀ and rCB2₄₁₀ isoform might influence the coupling of Gi/o with adenylyl cyclase and downstream signal transduction because rat rCB2₄₁₀ contains additional protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) consensus sites (S393 and S399, respectively) besides the common PKA consensus site (S336) that is conserved in the CB2 isoforms of other mammalian species (Fig. 5). It would be interesting to study the pharmacological and behavioral differences of rat strains that contain different C-terminal intracellular peptide sequences.

Retroposon B2 integration into 3'UTR of rCB2 might also affect rCB2 expression. Retroviral integration was also observed in mCB2 gene, and mCB2 3'UTR contains a frequent provirus insertion site (*Evi 11*) after Ca-Br-M murine leukemia virus (MuLV) inoculation of NIH/Swiss mice that developed malignancies (Joosten *et al.* 2000; Valk *et al.* 1997). The special 3'UTR sequences of rodent CB2 and the chromatin structure in this region might form an open DNA conformation to attract retropositions as observed in other genomic regions (Liu & Chan 1990). The B2 retroposon insertion into similar 3'UTR of rat rCB2 gene might also

change the expression of rCB2 and influence hematopoietic differentiation.

The specific human hCB2A isoform that is expressed predominantly in testis might indicate that human hCB2 has a potential function related to spermatogenesis and fertilization. Chronic administration of (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) induces impotence, reduction of testosterone and decrease of sperm viability (Hall & Solowij 1998; Murphy *et al.* 1994; Park *et al.* 2004). Mouse immature Sertoli cells of testis express mCB2 receptor on the plasma membrane with a CB2-specific agonist-binding profile (Maccarrone *et al.* 2003). Higher expression of hCB2A isoform in human testis might render humans more vulnerable to male gametotoxicity by cannabinoids. The detailed localization of hCB2A in human testis needs to be studied further by *in situ* hybridization and immunohistochemistry using human testis biopsy samples with specific nucleotide and antibody probes.

The species differences between the human and rodent CB2 gene are striking. A meta-analysis of previous studies showed significant differences in ligand-binding affinities between hCB2 and rCB2 (McPartland *et al.* 2007a). Human hCB2 gene is four times larger than that of rodents. If the transcription rates are similar between human and rodents, hCB2A isoform would take much longer time to be transcribed in testis and brain. This is unusual because other gene orthologs between humans and mice are usually within onefold differences in genomic sizes. The CB2A promoter distances to the spliced coding exon and the species-specific splicing mechanisms might reflect tissue-specific expression differences between humans and mice. CB2A isoform could be detected in human and mouse brain regions at such low levels of <0.1% and <1% of the highest expressed CB2 isoform of human and mouse spleen expression, respectively. However, a selective postsynaptic localization pattern has been observed in rat hippocampus (Brusco *et al.* 2008). CB2A expression level was higher in mouse brain than in human brain, but such immunohistochemical signals of CB2 has yet to be found in human brain regions.

Such promoter-specific CB2-R isoform distribution may in part explain why CB2-Rs were previously undetectable in both human and rodent brains using PCR primers designed in the region of CB2 exon 3 and Northern blot analysis (Brown *et al.* 2002; Griffin *et al.* 1999; Munro *et al.* 1993). Our study of CB2 isoform expression was more specific because the TaqMan probes were designed to hybridize the promoter exons and the major coding exon. TaqMan assay is more sensitive than *in situ* hybridization that was unable to detect significant mCB2 signals in mouse brain (Griffin *et al.* 1999; Munro *et al.* 1993). The weak mRNA signals of CB2 in brain would possibly be overcome by *in situ* PCR on brain slides using CB2A-specific primers to determine cellular types that express CB2A. Therefore, recent detection of mCB2 brain expression in mice by immunohistochemistry (Baek *et al.* 2008; Brusco *et al.* 2008; Gong *et al.* 2006; Van Sickle *et al.* 2005) might not represent human CB2 brain expression patterns because of different promoter activities in terms of quantity and quality for tissue distributions between human

and rodents. The CB2 isoform-specific TaqMan probes could differentiate the isoform-specific expression and are more sensitive and specific than CB2 antibodies that are currently available (N-terminal epitopes; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, and Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA., or C-terminal epitope; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.) that could not distinguish CB2 isoforms. The controversial CB2 brain expression in the literature could be of low expression of CB2A isoform in brain regions and less-specific CB2 commercial antibodies in immunohistochemistry studies, especially those studies using antibodies against human hCB2 epitopes for rodent brain immunostaining. The specificities of CB1 receptor antibodies were also controversial because they could not detect the native and transfected CB1 antigen, although they recognized unspecific proteins in Western blot and immunohistochemistry (Grimsey *et al.* 2008). The mCB2 knockout strain with ablation of N-terminal peptide of 156 amino acids (Deltagen, Inc., San Mateo, CA, USA) could clarify the specificity of the antibodies that were used against the N-terminal epitopes (human CB2 1–33 amino acids from Sigma and human10–33 amino acids from Cayman Chemical Company). Another CB2 knockout strain with ablation of C-terminal peptide of 131 amino acids (Buckley *et al.* 2000) could clarify the specificity of the antibodies that were used against C-terminal epitopes (human CB2 301–360 amino acids from Santa Cruz and rat 328–342 amino acids from Ken Mackie's lab) (Suarez *et al.* 2008).

CB2-specific agonists are under development for therapeutic treatment of inflammatory and neuropathic pain (Guindon & Hohmann 2008) with minimum psychoactive effects (Malan *et al.* 2003). Although cannabinoids significantly reduce chronic pain in animal models, they have less analgesic effects in human participants (Malan *et al.* 2003). The identification of novel human hCB2A isoform that is expressed at low levels in different brain regions might provide targets for any psychoactive side-effects for high doses of CB2 agonist-mediated anti-nociception treatment in humans that are not observed in mouse and rat models (Campbell *et al.* 2001). Another possible side-effect that should be considered is associated with the reproductive system because hCB2A is expressed at a high level in human testis. The differential polyadenylation at 3'UTR that generates 2.5 and 5.0 kb human hCB2 mRNA species might target hCB2 to different cell types and even different subcellular localizations (An *et al.* 2008; Liu *et al.* 2005) that might also differ from human and rodent.

The differential promoter activities and non-homologous 5'UTR and 3'UTR sequences in human and rodents might explain differential anti-nociceptive effects of CB2 agonists in human and rodent models. CB2 gene is conserved from fish to human and only an ancestral CB-R sequence was identified in some invertebrates (McPartland *et al.* 2006). Human *CNR2* gene structure and transcription mechanisms are quite different from those of rodent *Cnr2* gene. It would be interesting to compare the human *CNR2* gene with other primate *Cnr2* genes; however, the *Cnr2* genomic

sequences are still unavailable from other primate species such as chimpanzee and rhesus monkey. The CB2-R gene might evolve more rapidly in recent evolution time than CB1-R (McPartland *et al.* 2007b) to generate such species differences of CB2 gene structure, tissue expression and regulation that should be taken into account for developing analgesic drugs for different species. hCB2A gene is possibly still evolving because many new transcripts first appear in testes that possess the facilitated transcription mechanism. Some functional genes could then migrate out of testes to other tissues (Vinckenbosch *et al.* 2006).

One interesting result from our study is that the BTBR T+tf/J strain that has been reported to exhibit autism-like behavioral phenotypes showed a higher basal wheel running activity and was significantly sensitive to a low dose of BML-190 that induced wheel running activity in the BTBR mice in comparison with vehicle-treated controls (data not shown). Although recent data indicate increasing rates of autism in children, future studies should investigate the role of the cannabinoid system in the etiology of autism spectrum disorders. Some recent events have linked the anti-obesity drug Rimonabant, a CB1-R antagonist, an appetite suppressant with a higher risk of depression and suicide. However, our results showing an association of *CNR2* gene and depression in a human population (Onaivi *et al.* 2008) and an animal model suggest that cannabinoid CB2-R may be involved in the endocannabinoid signaling mechanisms associated with the regulation of emotionality. Thus, more studies are required to determine whether CB2-R ligands have the risk of depression or suicide that has led to the withdrawal of Rimonabant from use as an appetite suppressant in control of obesity. The studies here provide some of the first opportunities to elucidate candidate promoter regions for the hCB2 gene of continuing interest.

References

- Abood, M.E. (2005) Molecular biology of cannabinoid receptors. *Handb Exp Pharmacol* **168**, 81–115.
- An, J.J., Gharami, K., Liao, G.Y., Woo, N.H., Lau, A.G., Vanevski, F., Torre, E.R., Jones, K.R., Feng, Y., Lu, B. & Xu, B. (2008) Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* **134**, 175–187.
- Ashton, J.C., Wright, J.L., McPartland, J.M. & Tyndall, J.D. (2008) Cannabinoid CB1 and CB2 receptor ligand specificity and the development of CB2-selective agonists. *Curr Med Chem* **15**, 1428–1443.
- Baek, J.H., Zheng, Y., Darlington, C.L. & Smith, P.F. (2008) Cannabinoid CB2 receptor expression in the rat brainstem cochlear and vestibular nuclei. *Acta Otolaryngol* **128**, 961–967.
- Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Barg, J., Mechoulam, R. & Vogel, Z. (1995) The peripheral cannabinoid receptor: adenylyl cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett* **375**, 143–147.
- Benito, C., Tolon, R.M., Pazos, M.R., Nunez, E., Castillo, A.I. & Romero, J. (2008) Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* **153**, 277–285.
- Brown, S.M., Wager-Miller, J. & Mackie, K. (2002) Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* **1576**, 255–264.
- Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T. & Onaivi, E.S. (2008) Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse* **62**, 944–949.
- Buckley, N.E. (2008) The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol* **153**, 309–318.
- Buckley, N.E., McCoy, K.L., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, C.C., Glass, M. & Zimmer, A. (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* **396**, 141–149.
- Campbell, F.A., Tramer, M.R., Carroll, D., Reynolds, D.J., Moore, R.A. & McQuay, H.J. (2001) Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ* **323**, 13–16.
- Gerard, C., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* **18**, 7142.
- Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A. & Uhl, G.R. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* **1071**, 10–23.
- Griffin, G., Tao, Q. & Abood, M.E. (2000) Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 886–894.
- Griffin, G., Wray, E.J., Tao, Q., McAllister, S.D., Rorrer, W.K., Aung, M.M., Martin, B.R. & Abood, M.E. (1999) Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* **377**, 117–125.
- Grimsey, N.L., Goodfellow, C.E., Scotter, E.L., Dowie, M.J., Glass, M. & Graham, E.S. (2008) Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *J Neurosci Methods* **171**, 78–86.
- Guindon, J. & Hohmann, A.G. (2008) Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* **153**, 319–334.
- Hall, W. & Solowij, N. (1998) Adverse effects of cannabis. *Lancet* **352**, 1611–1616.
- Joosten, M., Valk, P.J.M. & Vankan, Y. *et al.* (2000) Phenotyping of Evil/Cb2, and Evil transformed leukemias isolated from a novel panel of Cas-Br-M murine leukemia virus-infected mice. *Virology* **268**, 308–318.
- Liu, Q.R. & Chan, P.K. (1990) Identification of a long stretch of homopurine.homopyrimidine sequence in a cluster of retroposons in the human genome. *J Mol Biol* **212**, 453–459.
- Liu, Q.R., Walther, D., Drgon, T., Poleskaya, O., Lesnick, T.G., Strain, K.J., de Andrade, M., Bower, J.H., Maraganore, D.M. & Uhl, G.R. (2005) Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **134B**, 93–103.
- Maccarrone, M., Cecconi, S., Rossi, G., Battista, N., Pauselli, R. & Finazzi-Agro, A. (2003) Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* **144**, 20–28.
- Mackie, K. (2008) Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol* **20**(Suppl 1), 10–14.
- Malan, T.P., Jr., Ibrahim, M.M., Lai, J., Vanderah, T.W., Makriyanis, A. & Porreca, F. (2003) CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol* **3**, 62–67.
- McPartland, J.M., Glass, M. & Pertwee, R.G. (2007a) Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br J Pharmacol* **152**, 583–593.
- McPartland, J.M., Matias, I., Di Marzo, V. & Glass, M. (2006) Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene* **370**, 64–74.
- McPartland, J.M., Norris, R.W. & Kilpatrick, C.W. (2007b) Tempo and mode in the endocannabinoid system. *J Mol Evol* **65**, 267–276.
- Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65.
- Murphy, L.L., Gher, J., Steger, R.W. & Bartke, A. (1994) Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on copulatory behavior and

- neuroendocrine responses of male rats to female conspecifics. *Pharmacol Biochem Behav* **48**, 1011–1017.
- Nunez, E., Benito, C., Tolon, R.M., Hillard, C.J., Griffin, W.S. & Romero, J. (2008) Glial expression of cannabinoid CB(2) receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome. *Neuroscience* **151**, 104–110.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T. *et al.* (2002) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* **420**, 563–573.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P. *et al.* (2008) Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS ONE* **3**, e1640.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Ari-nami, T., Teasenfiz, L. & Uhl, G.R. (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* **1074**, 514–536.
- Park, B., McPartland, J.M. & Glass, M. (2004) Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**, 189–197.
- Pazos, M.R., Nunez, E., Benito, C., Tolon, R.M. & Romero, J. (2004) Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci* **75**, 1907–1915.
- Schatz, A.R., Lee, M., Condie, R.B., Pulaski, J.T. & Kaminski, N.E. (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**, 278–287.
- Shire, D., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Oustric, D., Pessegue, B., Bonnin-Cabanne, O., Le Fur, G., Caput, D. & Ferrara, P. (1996) Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* **1307**, 132–136.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H. *et al.* (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16899–16903.
- Suarez, J., Llorente, R., Romero-Zerbo, S.Y., Mateos, B., Bermudez-Silva, F.J., de Fonseca, F.R. & Viveros, M.P. (2008) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* [Epub ahead of print].
- Sugiura, T. & Waku, K. (2002) Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem* **132**, 7–12.
- Valk, P.J., Hol, S. & Vankan, Y. *et al.* (1997) The genes encoding the peripheral cannabinoid receptor and a-L-fucosidase are located near a newly identified common virus integration site, Evil 1. *J Virology* **71**, 6796–6804.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D. & Sharkey, K.A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**, 329–332.
- Vinckenbosch, N., Dupanloup, I. & Kaessmann, H. (2006) Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3220–3225.
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S.H. & Davis, R.J. (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* **359**, 133–136.

Acknowledgments

This work was supported in part by NIDA/IRP and ESO acknowledges the technical assistance and financial support from William Paterson University Center for Research, Biology department, the Dean's (Dr De Young) student worker fund, and the Provost office for assigned release time. The CB2 knockout and their wild-type control mice were developed by Buckley *et al.* (2000), and obtained from NIAAA through Dr Kunos. Part of human brain tissue was obtained from the NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders at the University of Maryland, Baltimore, Maryland. The authors would also like to acknowledge the technical assistance of Dr Xia Li from Chemical Biology Research Branch and English editing by Dr Mary Pfeiffer, Editor and Writer NIDA, IRP. ALB and MPV acknowledges Red de Trastornos Adictivos (RD06/0001/1013). We thank Dr John McPartland for his excellent and in-depth review of the manuscript and for his suggestions.

Consequences of Cannabinoid and Monoaminergic System Disruption in a Mouse Model of Autism Spectrum Disorders

E.S. Onaivi^{1,2,*}, R. Benno¹, T. Halpern¹, M. Mehanovic¹, N. Schanz¹, C. Sanders¹, X. Yan¹, H. Ishiguro^{2,3}, Q-R Liu⁴, A.L. Berzal⁵, M.P. Viveros⁵ and S.F. Ali⁶

¹William Paterson University, Wayne, USA; ²Molecular Neurobiology Branch, National Institute on Drug Abuse, NIH, Baltimore, USA; ³Ikedo Hospital, Happonkai Medical Corporation, Ryugasaki, Japan; ⁴Behavioral Neurobiology Branch, National Institute on Drug Abuse, NIH, Baltimore, USA; ⁵Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain; ⁶Neurochemistry Laboratory, NCTR/FDA, Jefferson, AR, USA

Abstract: Autism spectrum disorders (ASDs) are heterogeneous neurodevelopmental disorders characterized by impairment in social, communication skills and stereotype behaviors. While autism may be uniquely human, there are behavioral characteristics in ASDs that can be mimicked using animal models. We used the BTBR T+tf/J mice that have been shown to exhibit autism-like behavioral phenotypes to 1). Evaluate cannabinoid-induced behavioral changes using forced swim test (FST) and spontaneous wheel running (SWR) activity and 2). Determine the behavioral and neurochemical changes after the administration of MDMA (20 mg/kg), methamphetamine (10 mg/kg) or MPTP (20 mg/kg). We found that the BTBR mice exhibited an enhanced basal spontaneous locomotor behavior in the SWR test and a reduced depressogenic profile. These responses appeared to be enhanced by the prototypic cannabinoid, Δ^9 -THC. MDMA and MPTP at the doses used did not modify SWR behavior in the BTBR mice whereas MPTP reduced SWR activity in the control CB57BL/6J mice. In the hippocampus, striatum and frontal cortex, the levels of DA and 5-HT and their metabolites were differentially altered in the BTBR and C57BL/6J mice. Our data provides a basis for further studies in evaluating the role of the cannabinoid and monoaminergic systems in the etiology of ASDs.

Keywords: Cannabinoid, Monoamines, Δ^9 -THC, Psychostimulants, MPTP, Behavior, Autism, BTBR T+tf/J mice.

INTRODUCTION

Autism is a behaviorally defined neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social interaction and communication and repetitive/stereotyped behaviors [1, 2]. The cause of autism is not completely understood and there is no effective cure. However, genetic and environmental factors and the interaction between genes and environment are known to play a role in Autism Spectrum Disorders (ASDs) [3-7]. A common genetic variant on chromosome 5p14.1 was shown to associate with ASDs using genome-wide association studies [6] and there are currently a number of other autism susceptibility candidate genes (ASCG) that may be involved [7]. New thinking and hypothesis have been generated to include epigenetic mechanisms in ASDs [8, 9]. This is because of the complexity of ASDs and the understanding that alteration of gene function could be due to a polymorphism in DNA sequence or epigenetic programming changes of genes in the interaction with environment without change of DNA sequences [10].

We recognize that the symptoms of ASDs are difficult to model in rodents because of the absence of verbal communication and the variability of symptoms. Nevertheless, a number of relevant behavioral and social changes have been

documented in transgenic mouse models of ASDs. Specifically mouse behavioral tests modeling some of the core symptoms of autism have now been established [11]. The goal of this study, was to use the mouse model to determine the role if any of the endocannabinoid system in autism. This was accomplished using the BTBR T+tf/J mice with autism-like behavioral phenotypes. The behavioral, morphological and neurochemical alterations in this model will allow us to test our hypothesis about the causes of autism, and may serve as an index for the evaluation of proposed treatment strategies in combination with other transgenic models. The rationale for this novel hypothesis arises from the discovery that the endocannabinoid system is one of the most abundant physiological control systems in animals and humans. This system is intricately involved with embryo development and growth with limitless interaction with most biological systems including the monoaminergic systems. The endocannabinoid system consists of genes that encode cannabinoid receptors, endogenous ligands that activate these receptors and the enzymes that synthesize, degrade and perhaps reuptake the endocannabinoids [12]. While the endocannabinoid system is ubiquitous and interacts with most biological systems, the role it plays in ASDs is unknown. We recently observed that the basal level of CB2A gene expression in the BTBR T+tf/J mice was upregulated in the cerebellum compared to control mice [13]. Therefore, we have begun studies to determine the behavioral effects of cannabinoid ligands in the BTBR mice in comparison to control groups.

*Address correspondence to this author at the Department of Biology, William Paterson University Wayne, NJ 07470, USA; Tel: +1 973-720-3453; Fax: +1 973-720-2338; E-mail: Onaivie@wpunj.edu

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male and female BTBR T+tf/J, C57BL/6J and 129SI/SvImJ (S129) mouse strains were housed in individual cages with access to mouse chow 12 hr in the light and 12 hr in the dark. Experiments were conducted according to standard NIH guidelines and approved by Institutional Animal Care and Use Committee.

Drugs

Δ^9 -THC was obtained from our collaborators in NIDA intra-mural program and it was made up in a 1:1:18 solution of alcohol: emulphur: saline. MDMA, methamphetamine, and MPTP were obtained from our FDA collaborators. Animals were injected intra-peritoneal (i.p) using 1.0 and 10 mg/kg doses of Δ^9 -THC and the control animals were injected with the vehicle. The doses of MDMA (20 mg/kg), methamphetamine (10 mg/kg), MPTP (20 mg/kg) or d-amphetamine (5 mg/kg) were used. In all experiments all drugs were injected in a volume of 1ml/kg.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Motor Function Test

Spontaneous wheel running monitors were used to access motor activity and function. The standard wheel running activity monitors measures the counts per revolution and was used to access the spontaneous wheel running behavior of naïve mice and following acute treatment with the test compounds and corresponding vehicle used. The wheel running activity of the animals were monitored by the auto-counters, for 10 minutes during the assessment of spontaneous wheel running activity following specific drug pretreatment times. Data was obtained as total number of revolutions over the 10 min evaluation period. The performance of the animals following the acute administration of the test compounds to the mouse strains were compared to their respective vehicle treated controls.

Forced Swim Test

The forced swim test (FST) paradigm was used. It consists of a glass cylinder (16 cm diameter and height 35 cm) filled to a depth 15 cm with water (23-25°C). One glass cylinder was used for each mouse and we tested six mice at a time using six glass cylinders and test observers. In this study a two-day swim test procedure was utilized first to access the basal performance of the different mouse strains. On the first day mice were placed in the glass cylinder with water to the specified depth, and all animals were exposed for 15-min pre-swim test prior to the 5-min forced swim test on day 2. Fresh water was introduced prior to each test. The test sessions were recorded by trained observers for consistent data recording. The observer used stop watches and counters to record immobility times and counts respectively. The data recorded during the 5-min test session were the times the animals were immobile and also the number of immobility counts during the test session. Similar data was obtained for the vehicle treated naïve control animals. During the test session the duration of immobility was defined by the animal's stationary position, and only made the minimal movements necessary to keep the head above water.

Neurochemical Analysis of Dopamine (DA) and Serotonin (5HT) and their Metabolites in Selected Brain Areas

Prior to preparation of animals for selected brain region dissection for neurochemical analysis, animals were scheduled for three saline or three drug injections that were given about 8 hrs apart for one day only. Mice in the different groups were injected with saline (n = 10) or these test compounds (n = 10/per group): methamphetamine (10 mg/g); MDMA (20 mg/kg) or MPTP (20 mg/kg). After the completion of drug or vehicle administration, mice were housed one per cage for two days before the animals were sacrificed two days later, and the striatum, frontal cortex and hippocampus were dissected and frozen at -80°C. All frozen samples were shipped to the FDA for the neurochemical analysis. Briefly, tissues from the different groups were prepared for high performance liquid chromatography (HPLC) combined with electrochemical detection to determine dopamine (DA), 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA).

CANNABINOID GENOMIC ANALYSIS IN BTBR MICE

In a previous study Liu *et al.*, 2009, [13], during the analysis of CB2-R gene expression in different brain regions of C57BL/6 mice treated with the mixed cannabinoid agonist WIN55212-2 (2mg/kg) for 7 days, we also analyzed CB2-gene expression in non-injected BTBR mice. This was accomplished by the analysis of CB2A and CB2B gene expression in brain regions, testis and the spleen. Briefly, RNA was isolated using TRIzol reagent and cDNA synthesized using SuperScript III first strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). The expression of CB2A and CB2B genes were compared by TaqMan real-time PCR with an ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System, using custom designed Fam-labeled MGB probes and primers for CB2A and CB2B (Applied Biosystems, Foster City, CA). The custom-designed mouse beta-actin Fam-labeled MGB probe was used for normalization [13].

Statistical Analysis

Prism-3 program, version 3.02 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses, including *t*-tests and analysis of variance (ANOVA). Data from motor function and forced swim tests were subjected to analysis of variance for multiple comparisons followed by Turkey's test where appropriate. For CB1 and CB2 gene expression analysis, unpaired *t*-test was used. The accepted level of significance is $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of Δ^9 -THC, Psychostimulants and Disruption of Monoaminergic System by MPTP on Motor Activity in the Mouse Model of ASD

The naïve untreated BTBR mice exhibited an enhanced basal locomotor activity as recorded in the spontaneous wheel running test. The BTBR males had slightly higher activity than the females and the motor activity of the males of the C57BL/6J were significantly lower ($p < 0.05$, $N = 10$)

than the activity of the BTBR males as shown in Fig. (1A). The effects of d-amphetamine treatment in the three mouse strains varied, with the S129 mouse showing significant locomotor activation compared to both BTBR and C57BL/6J mice as shown in Fig. (1B). A similar response of male and female mice in motor activity was recorded following the acute treatment of BTBR and C57BL/6J, with methamphetamine and MDMA (Fig. (1C)). The motor activity of C57BL/6J male mice was significantly reduced compared to

those of the BTBR mice after treatment with the dopaminergic neurotoxin MPTP as shown in Fig. (1C). However, the motor activity of BTBR mice when compared to those of C57BL/6J and S129 mice were significantly reduced and more sensitive to the higher dose of 10 mg/kg Δ^9 -THC used in this study as shown in Fig. (2C). At the doses used in this study Δ^9 -THC actually enhanced motor activity in the C57BL/6J and S129 mice which were the control background mice for the BTBR animals.

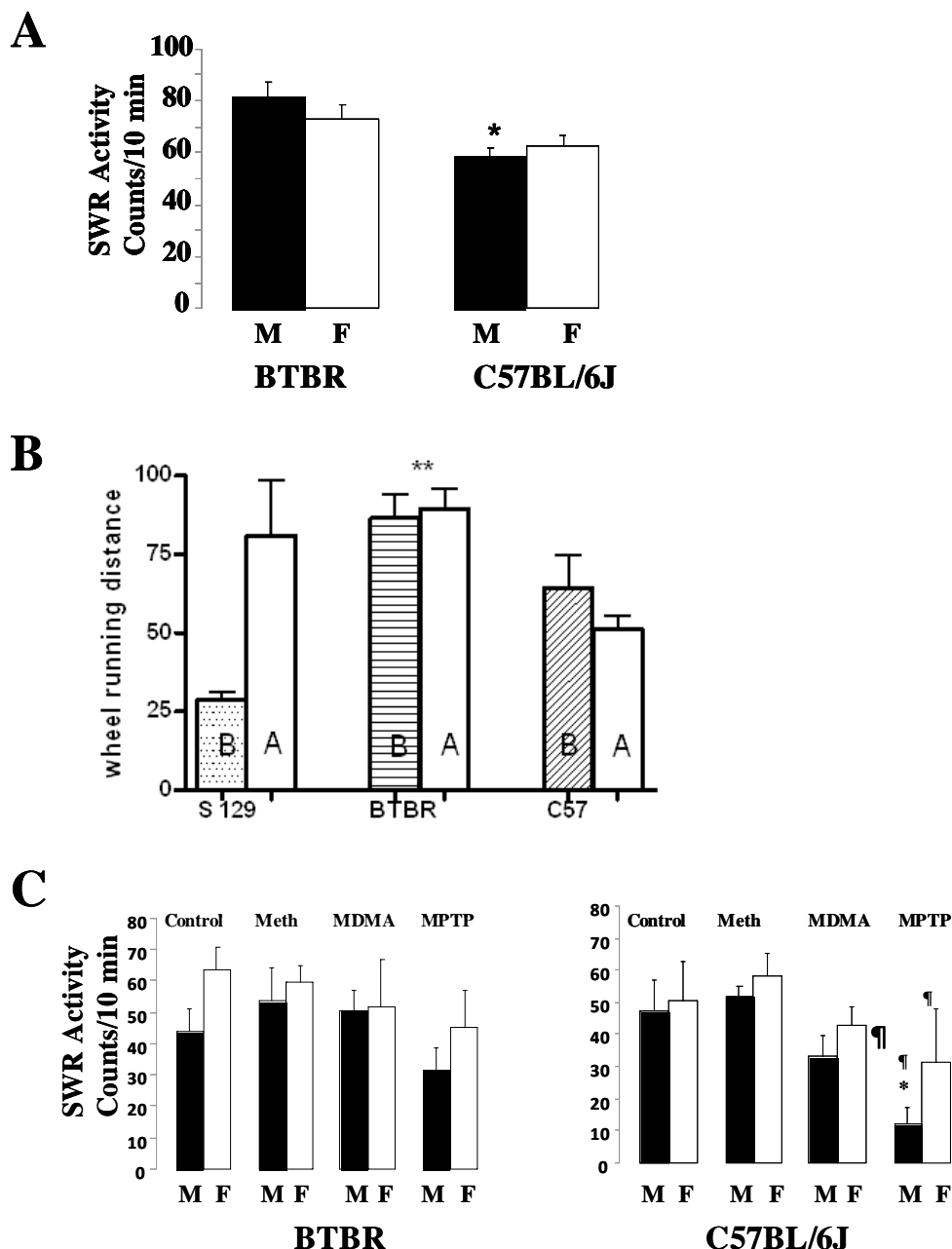


Fig. (1). The effects of psychostimulants (d-amphetamine, Methamphetamine and MDMA), and disruption of monoaminergic system by the neurotoxin (MPTP), in a mouse model of autism spectrum disorders. Panel A shows the basal motor activity of male and female BTBR and C57BL/J mice in the spontaneous wheel running (SWR) monitors; panel B is the effect of acute 10 min treatment with d-amphetamine (5.0 mg/kg) on the performance of male BTBR and the male controls, S129 and C57BL/6J mice. Panel C shows the effects of acute administration of methamphetamine (10 mg/kg), MDMA (20.0 mg/kg) and MPTP (20 mg/kg) in both male and female BTBR and C57BL/6J mice in comparison to their respective controls. The duration of the wheel running behavior was accessed over a 10 min period in all animals tested. * or ¶ represents statistical significance at $p < 0.05$ as compared to the same gender.

Behavioral Effects of BTBR, C57BL/6J and S129 Mice in the Forced Swim Test after Treatment with a Cannabinoid, Δ^9 -THC:

The naïve BTBR mice demonstrated reduced immobility time and increased immobility count when compared to C57BL/6J and S129 mice in the FST, as shown in Fig. (2A). Surprisingly, in the FST, Δ^9 -THC at the doses used did not modify the immobility time and counts of the BTBR mice when compared to the C57BL/6J and S129 mice as shown in Fig. (2B).

Neurochemical Determination of DA and 5HT Levels and their Metabolites after Treatment with Methamphetamine, MDMA and MPTP

The levels of dopamine, serotonin and their metabolites were analyzed in the striatum, frontal cortex and the hippocampus after the treatment of different strains of mice with

methamphetamine, MDMA and MPTP. Data on striatal DA and 5HT levels and frontal cortex 5HT levels are presented in Fig. (3). In this preliminary neurochemical analysis of DA, 5HT and their metabolite levels in the striatum, frontal cortex and hippocampus after the drug treatments, the levels of these monoamines and their metabolites were differentially altered in the BTBR and C57BL/6J mice used, see Fig. (3). The variable levels of monoamines made it difficult to define a specific association of these changes with the underlying features in the mouse model of ASDs. There are however some striking observations that can be gleaned from the effects of the doses used in drug treatments and the analyzed comparative striatal data between BTBR and C57BL/6J mice: Methamphetamine lowered BTBR DA levels relative to controls with no effect on C57BL/6J DA levels whereas MPTP had no effect on DA levels in BTBR mice relative to their controls, but lowered C57BL/6J DA levels. On the other hand MDMA had little or no significant effect on ei-

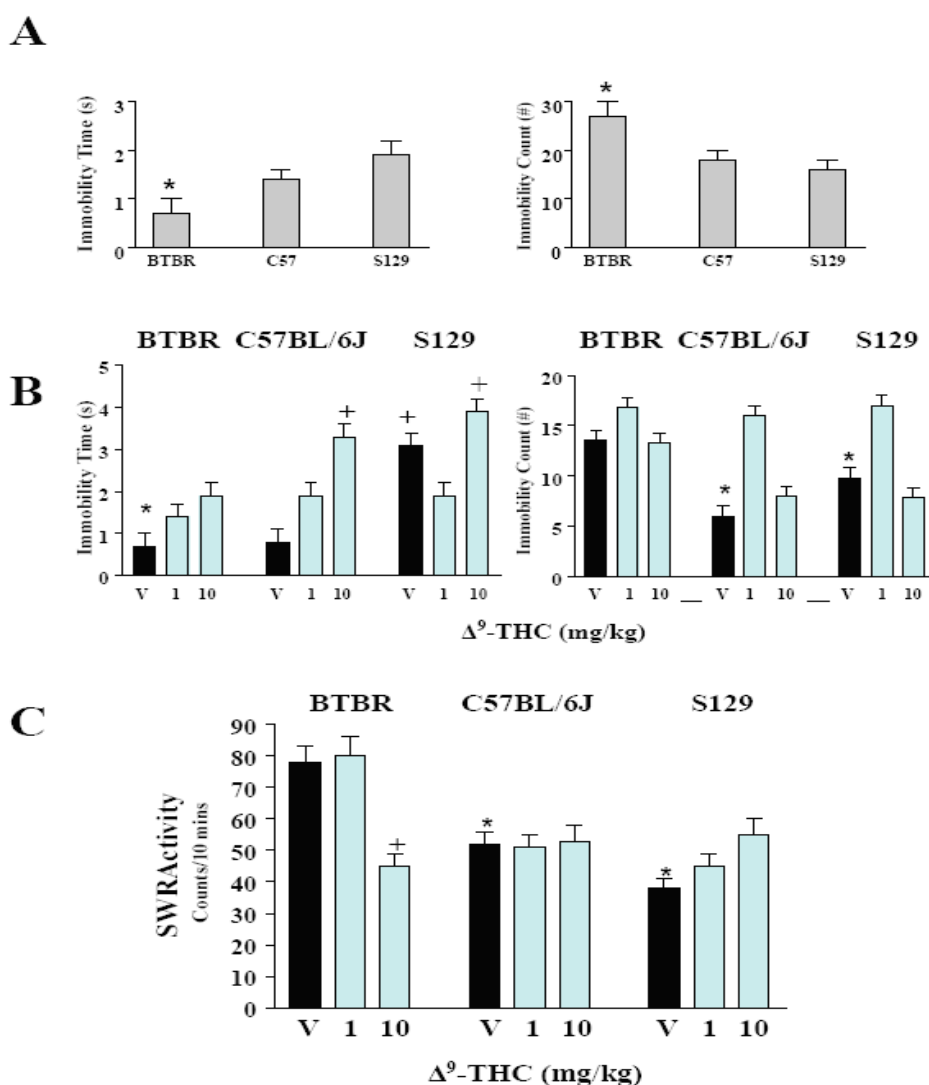


Fig. (2). Behavioral effects of BTBR, C57BL/6J and S129 mouse strains in the FST. Panel A shows the basal levels of performance indicated by the time and number of immobility by the three mouse strains in the forced swim test model. Panel B is time and number of immobility after acute treatment of the mouse strains with Δ^9 -THC (1 and 10 mg/kg) in comparison to vehicle treated controls. Panel C shows the influence of acute treatment of the mouse strains with Δ^9 -THC (1 and 10 mg/kg) in the spontaneous wheel running activity monitors. * or + represents statistical significance at $p < 0.05$ with strains and drug treatment in the behavioral measures.

ther BTBR or C57BL/6J DA levels in comparison to their respective controls.

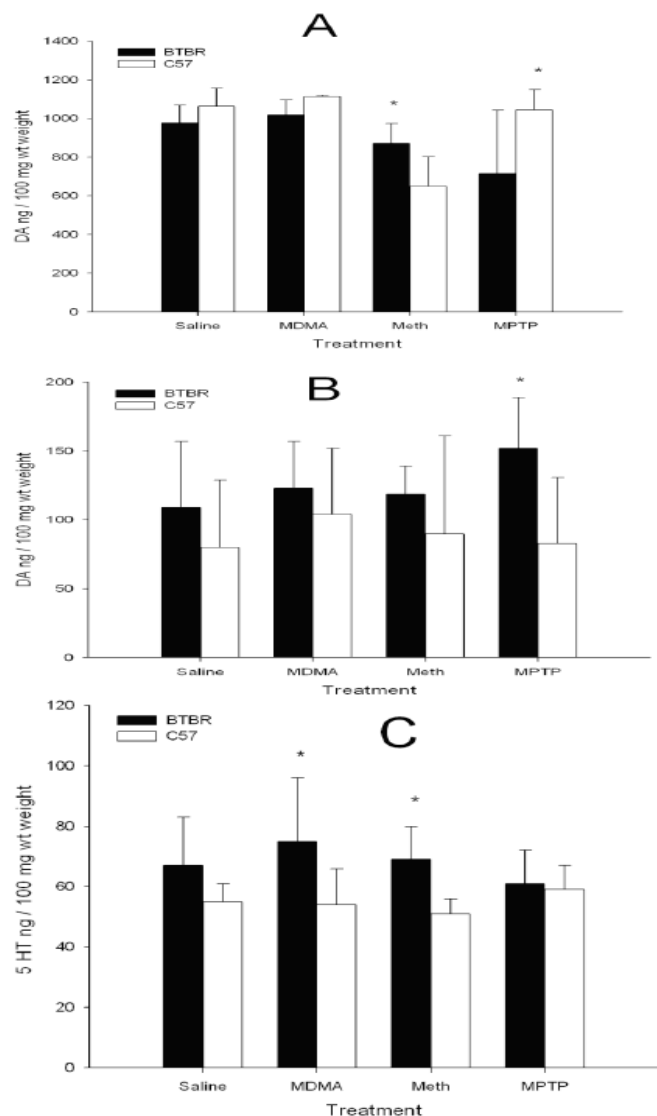


Fig. (3). Neurochemical analysis of dopamine (DA) and serotonin (5HT) levels in striatum and frontal cortex in BTBR and C57BL/6J male and female mice following a single day three times administration of either saline, methamphetamine (10 mg/kg), MDMA (20 mg/kg) or MPTP (20 mg/kg). Regional brain areas were dissected 2 days later. Since there were no significant sex differences the data was collapsed on the variable sex. Panel **A** is the striatal dopamine level in BTBR relative to C57BL/6J mice. Panel **B** is the frontal cortex dopamine level in the two strains of mice. Panel **C** is the striatal serotonin level. *Represents statistical significance at $p < 0.05$ using a least squares means analysis. Significance tests were performed between the two strains of mice for each of the treatments independently.

Cannabinoid CB2A Gene Expression is Upregulated in BTBR Mice

We have previously shown that naive BTBR mice that have been reported to have autism-like behavioral phenotypes have an upregulated higher levels of CB2A gene

expression in the cerebellum without treatment with cannabinoids. This upregulation occurred usually only after sub-acute treatment with a mixed cannabinoid agonist, WIN55212-2 in the C57BL/6J mice [13]. However, no significant changes were observed in other brain regions including frontal cortex and striatum - brain areas evaluated in the current study and the hypothalamus (data not shown). The expression level of CB2B in the mouse brain is lower than CB2A and the mRNA levels could not be reliably measured by TaqMan assay (data not shown).

DISCUSSION

While autism may be uniquely human, we have investigated the consequences of cannabinoid and monoaminergic system disruption in the BTBR T+tf/J mice that have been shown to exhibit autism-like behavioral phenotypes. We report that the BTBR mice exhibited an enhanced basal spontaneous locomotor behavior in the spontaneous wheel running (SWR) test, a measure of locomotor activity, that was reduced by the prototypic cannabinoid, Δ^9 -THC. In addition, this enhanced spontaneous wheel running behavior was sexually dimorphic as the motor activity in the naïve male BTBR mice was significantly higher than those of the naïve male C57BL/6J mice without significant alteration in the female mice. Furthermore, the doses of the psychostimulants, d-amphetamine, methamphetamine and MDMA used in this study did not modify the SWR behavior in the BTBR mice whereas MPTP reduced SWR activity in the control C57BL/6J mice. One characteristic of ASDs is stereotype behavior characterized by high levels of repetitive self-grooming behavior that has recently been shown to be reduced in the BTBR mice by methyl-6-phenylethynl-pyridine (MPEP) – an mGluR5 antagonist [14]. It is tempting to suggest the evaluation of Δ^9 -THC or other cannabinoids with reduced psychoactivity in irritability, tantrums and self-injurious behavior associated with autistic individuals. This is because at the low doses used in this study, only the BTBR mice were sensitive to motor depressant effects of Δ^9 -THC when compared to those of C57BL/6J and S129 mice. This hypothesis is further supported by our data showing that the BTBR mice were also insensitive to the locomotor activation induced by psychostimulants and the neurotoxic effects of MPTP when compared to those of C57BL/6J and S129 mice.

An unusual behavioral phenotype characterized by exaggerated responses to stress in the BTBR mouse has been demonstrated [15]. The study showed that the BTBR mice had increased levels of the stress hormone corticosterone following tail suspension, and a heightened anxiety response in the plus-maze test, when compared to C57BL/6J mice [15]. In our current study, there were marked strain differences in immobility times and counts in the FST model of depression and BTBR mice displayed a reduced immobility time and an enhanced immobility count compared to the control C57BL/6J and S129 mice. Curiously however, Δ^9 -THC at the doses used in this study did not modify the immobility time and counts in BTBR mice when compared to the C57BL/6J and S129 mice whose immobility times and counts were differentially modified dose dependently by Δ^9 -THC.

The cause of autism is unknown, but there has been much progress and new knowledge with the environment, epigenetics and genetic factors all playing some role in the etiology of ASDs. For example multiple gene variants and genome-wide copy number variations have been reported in children with ASDs, but not in healthy controls [16]. Data from comparative genomics of autism and schizophrenia support the hypothesis that autism and schizophrenia represent diametric conditions with regard to their genomic underpinnings and phenotypic manifestations [16]. Our data indicating that the BTBR mice have an abnormal regulation of DA functioning with an upregulated CB2A gene expression in naïve BTBR mouse of ASDs [13], and our finding indicating an increased risk of schizophrenia in patients with low CB2 receptor function [17], is in agreement with the hypothesis that autism and schizophrenia represent diametric conditions [16]. Moreover, more research needs to be done to understand the nature of the neurochemical changes recorded in our preliminary study in the hippocampus, striatum and frontal cortex, where the levels of DA and 5-HT and their metabolites were differentially altered in the BTBR and C57BL/6J mice. Thus our data provides a basis for further studies in evaluating the role of the cannabinoid and monoaminergic systems in the etiology of ASDs and whether the BTBR mice can model both schizophrenia and ASDs.

ACKNOWLEDGEMENTS

ESO acknowledges financial support from William Paterson University center for research, the Dean, Dr. Sandra DeYoung for continued student worker support and the Provost office for release time. ESO acknowledges Guest Scientist support at NIDA-NIH. QRL is supported by NIDA-NIH. ALB and MPV acknowledges support from Red de Trastornos adictivos RD06/0001/1013; GRUPOS UCM-BSCH: 951579; Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad y Política Social 2010-2012. Ref.: PR10/09-16583

REFERENCES

- [1] King, B.H., Bostic, J.Q. An update on pharmacologic treatments for autism spectrum disorders. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.*, **2006**, *15*, 161-175.
- [2] Nickels, K.C., Katusic, S.K., Colligan, R.C., Weaver, M.S., Voigt, R.G., Barbaresi, W. J. Stimulant medication treatment of target behaviors in children with autism: A population-based study. *J. Dev. Behav. Pediatr.*, **2008**, *29*, 75-81.
- [3] Robinson, P.D., Schutz, C.K., Macciardi, F., White, B.N., Holden, J.A. Genetically determined low maternal serum dopamine b-hydroxylase levels and etiology of autism spectrum disorders. *Am. J. Med. Genet.*, **2001**, *100*, 30-36.
- [4] Yrigollen, C.M., Han, S.S., Kochetkova, A., Babitz, B., Chang, J.T., Volkmar, F.R., Leckman, J.F., Grogorenko, E.L. Genes controlling affiliative behavior as candidate genes for autism. *Biol. Psychiatry*, **2008**, *63*, 911-916.
- [5] Page, D.T., Kuti, O.J., Prestia, C., Sur, M. Haploinsufficiency for pten and serotonin transporter cooperatively influences brain size and social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 1989-1994.
- [6] Wang, K., Zhang, H., Ma, D., Bucan, M., Glessner, J.T., Abrahams, B.S., Salyakina, D., Imielinski, M., Bradfield, J.P., Sleiman, P.M.A., Kim, C.E., Hou, C., Frackelton, E. Hakonarson, H. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*, **2009**, *459*, 528-533.
- [7] Bill, B.R., Geschwind, D.H. Genetic advances in autism: heterogeneity and convergence on shared pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2009**, *19*, 271-278.
- [8] Mehler, M.F., Purpra, D.P. Autism, fever, epigenetics and the locus coeruleus. *Brain Res. Rev.*, **2008**, *59*, 388-392.
- [9] Jones, J.R., Skinner, C., Friez, M.J., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E. Hypothesis: Dysregulation of methylation of brain expressed genes on the X chromosome and autism spectrum disorders. *Am. J. Med. Genet. Part A*, **2008**, *146A*, 2213-2220.
- [10] Szyf, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2009**, *49*, 243-263.
- [11] Crawley, J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.*, **2007**, *17*, 448-459.
- [12] Onaivi, E.S. Cannabinoid receptors in brain: pharmacogenetics, neuropharmacology, neurotoxicology, and potential therapeutic applications. *Int. Rev. Neurobiol.*, **2009**, *88*, 335-369.
- [13] Liu, Q.R., Pan, C.H., Hishimoto, A., Li, C.Y., Xi, Z.X., Llorente-Berzal, A., Viveros, M.P., Ishiguro, H., Arinami, T., Onaivi, E.S., Uhl, G.R. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Gene Brain Behav.*, **2009**, *8*, 519-530.
- [14] Silverman, J.L., Tolu, S.S., Barkan, C.L., Crawley, J.N. Repetitive Self-Grooming Behavior in the BTBR Mouse Model of Autism is Blocked by the mGluR5 Antagonist MPEP. *Neuropsychopharmacology*, **2009**, 1-14. (Online ahead of print).
- [15] Benno, R., Smirnova, Y., Vera, S., Liggett, A., Schanz, N. Exaggerated responses to stress in the BTBR T+tf/J mouse: An unusual behavioral phenotype. *Behav. Brain Res.*, **2009**, *197*, 462-465.
- [16] Crespi, B., Stead, P., Elliot, M. Comparative genomics of autism and schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 1-6. (Online ahead of print).
- [17] Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Ishikawa, M., Koga, M., Imai, K., Suzuki, Y., Morikawa, M., Inada, T., Watanabe, Y., Takahashi, M., Someya, T., Ujike, H., Iwata, N., Ozaki, N., Onaivi, E.S., Kunugi, H., Sasaki, T., Itokawa, M., Arai, M., Niizato, K., Iritani, S., Naka, I., Ohashi, J., Kakita, A., Takahashi, H., Nawa, H., Arinami, T. Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, **2010**, *67*, 974-982.

The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications

MP Viveros¹, R Llorente¹, J Suarez², A Llorente-Berzal¹,
M López-Gallardo³ and F Rodríguez de Fonseca²

Journal of Psychopharmacology

26(1) 164–176

© The Author(s) 2012

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0269881111408956

jop.sagepub.com



Abstract

This review focuses on the endocannabinoid system as a crucial player during critical periods of brain development, and how its disturbance either by early life stressful events or cannabis consumption may lead to important neuropsychiatric signs and symptoms. First we discuss the advantages and limitations of animal models within the framework of neuropsychiatric research and the crucial role of genetic and environmental factors for the establishment of vulnerable phenotypes. We are becoming aware of important sex differences that have emerged in relation to the psychobiology of cannabinoids. We will discuss sexual dimorphisms observed within the endogenous cannabinoid system, as well as those observed with exogenously administered cannabinoids. We start with how the expression of cannabinoid CB₁ receptors is regulated throughout development. Then, we discuss recent results showing how an experimental model of early maternal deprivation, which induces long-term neuropsychiatric symptoms, interacts in a sex-dependent manner with the brain endocannabinoid system during development. This is followed by a discussion of differential vulnerability to the pathological sequelae stemming from cannabinoid exposure during adolescence. Next we talk about sex differences in the interactions between cannabinoids and other drugs of abuse. Finally, we discuss the potential implications that organizational and activational actions of gonadal steroids may have in establishing and maintaining sex dependence in the neurobiological actions of cannabinoids and their interaction with stress.

Keywords

Adolescence, animal models, cannabinoid receptors, early life stress, neuropsychiatric disorders, sexual dimorphisms

Preliminary considerations

Psychiatric disorders are a major burden for healthcare systems. Their high prevalence and social impact, especially for caregivers, demand a major effort for their prevention and treatment. Understanding the nature and origin of major psychiatric disorders is one of the most challenging enterprises of modern biomedical research because they are not simple results of genetic defects, nor inevitable outcomes of life events. The interaction between genetics and environment during crucial phases of development, including early postnatal life and adolescence, seems to be the starting point of endophenotypes of vulnerability to mental health problems. As shown in Figure 1(A), the impact of specific external factors upon a genetically determined programme of development can set the stage for the triggering of a psychiatric disorder by external factors in adulthood. The present review focuses on the role of the endogenous cannabinoid system (ECS) as a target for both genetic determinants of neural development and epigenetic alterations of brain maturation, especially during adolescence.

Why animal models are useful in neuropsychiatry

One obvious limitation in developing animal models for psychiatric diseases is that, due to the nature and complexity of

human symptoms, it is impossible to reproduce a disease in its entirety. However, several experimental models have been developed in an attempt to mimic specific signs of various neuropsychiatric disorders. These procedures allow experimental controls that are not possible in human studies, and provide a valuable approach for the investigation of neurobiological substrates.

The present review dedicates special attention to the impact of early postnatal life events, focusing mostly on animal studies that investigate the importance of the adolescence phase. Adolescent behaviours are shared across species; for example, adolescent rodents exhibit a particular

¹Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

²Laboratorio de Medicina Regenerativa, Fundación IMABIS, Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain.

³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

Corresponding author:

Maria-Paz Viveros, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, C/ Jose Antonio Novais n° 2, 28040 Madrid, Spain
Email: pazviver@bio.ucm.es

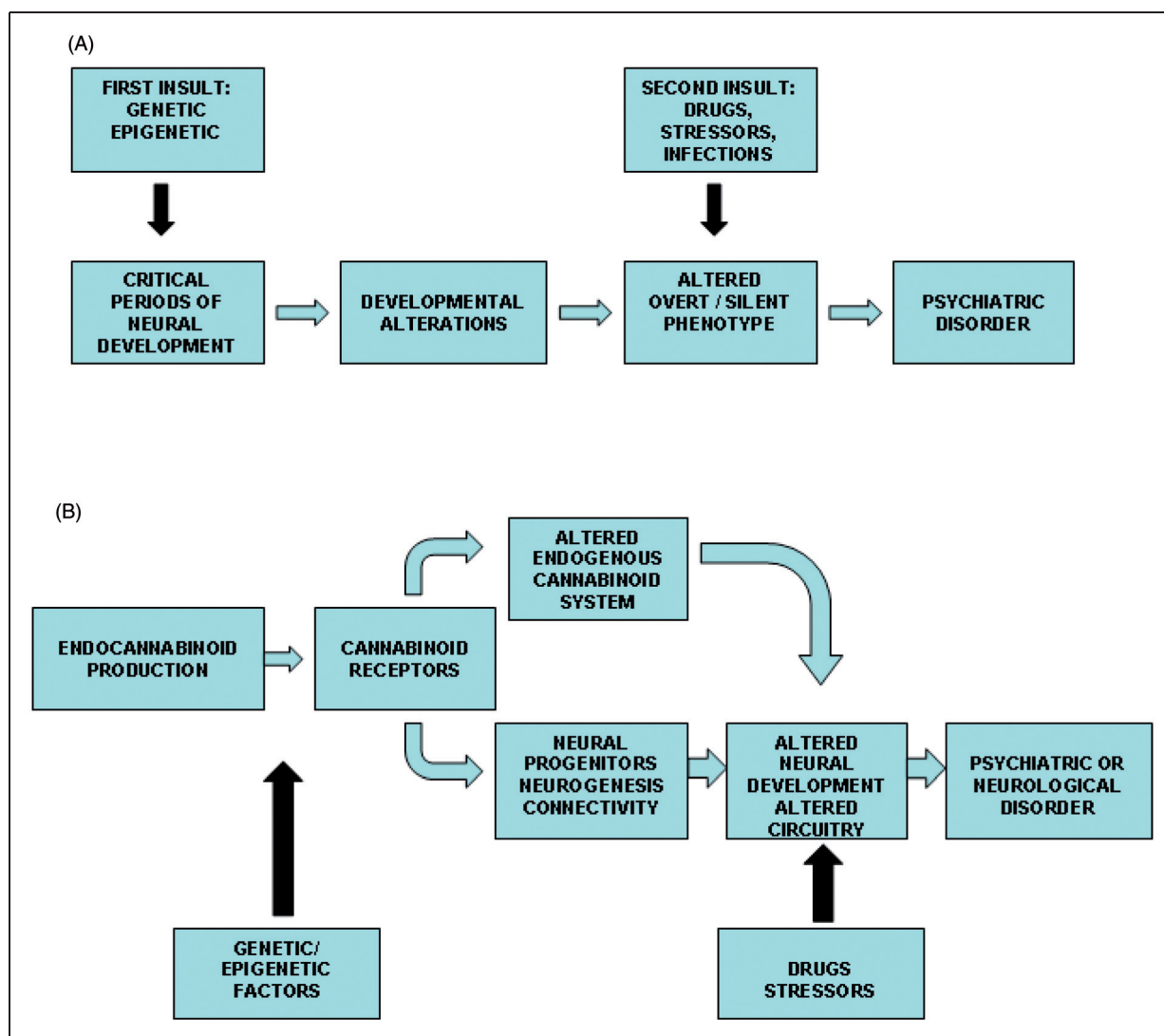


Figure 1. (A) Neural development may be disrupted by the action, during critical periods of life, of both endogenous (i.e. mutations or alterations in the genetic contribution to normal development) or exogenous factors (i.e. epigenetic consequences of early life events, drugs, hormones/endocrine disruptors, infections, etc). This disruption may lead to a new phenotype that may be either overtly expressed or silent. The impact of a second insult in these altered phenotypes (i.e. exposure to stressors, drugs of abuse, etc) may lead in adult life to the onset of a psychiatric disorder. (B) The ECS has been described as being one of the targets for the model described above. Either genetic alterations on endocannabinoid signalling (i.e. mutation on the endocannabinoid degradatory enzyme ABH12 in humans) or the impact of epigenetic factors (i.e. maternal deprivation, mild stress, exposure to drugs) may lead to overt/silent vulnerable phenotypes. Because of the well-known role of the ECS on neural development and plasticity (modulation of neurogenesis, fate of neural precursors, survival, neuritogenesis and connectivity), the impact of genetic/epigenetic factors during critical period may lead to altered circuitry in both non-cannabinoid (i.e. dopaminergic) and/or cannabinoid signalling processes in adulthood. This new vulnerable phenotype has been proposed to contribute to the appearance of psychiatric disease when a concurrence factor (a new stressor, abuse of drugs) occurs during adult life.

behavioural repertoire that resembles human adolescent behaviour, including high levels of exploration, novelty and sensation seeking, impulsivity and an increased sensitivity to incentives. These behaviours have been suggested to help adolescents develop the social skills needed when they become independent from their family or become adults in their group. High levels of novelty/sensation-seeking behaviours appear to be strong predictors of

drugs use among adolescents. In addition, while the brain's emotion-related areas and connections are still maturing, adolescents are more vulnerable to psychological disorders (for a review see Adriani and Laviola, 2004; Crews et al., 2007; Laviola et al., 2003; Spear, 2000). Studying the adolescent phase of animals as a model of human adolescence is thus useful for investigating the risk for addictive and other early onset neuropsychiatric disorders. The increasing

risk of developing these disorders that emerge during adolescence has encouraged the investigation of their neurobiological basis, and this particular topic might serve to highlight aberrations in the key developmental domains of cognition, affect and motivational behaviour. While no animal model can represent the full phenotypic spectrum of a psychiatric disorder, such as schizophrenia or depression, specific phenotypic components of disorders can be used to design adequate animal models that are useful to unravel disease mechanisms and that may allow testing novel therapeutic interventions (Adriani and Laviola, 2004; Giedd et al., 2008).

Genetic and epigenetic factors: the key for silent phenotypes

The main psychiatric disorders, and schizophrenia in particular, are thought to be disorders of brain development. As the brain approaches its adult anatomical and physiological state in adolescence, both genetic and environmental factors may initiate a pathological process that leads to the emergence of the disease (for a review see Fatemi and Folsom, 2009). Any animal model designed to test or investigate the neurodevelopmental hypothesis of mental disorders must consistently consider the impact of genetic and environmental factors. Furthermore, this consideration has to address a very important aspect: the incidence of major mental disorders (i.e. depression, psychosis, bipolar disorders) peaks soon after the end of brain maturation, after adolescence. As happens in humans, the animal model has to provide a 'silent phenotype' that may be revealed in adulthood by challenging the animal with external factors, including environmental manipulations (i.e. housing, feeding, temperature), stressors, drug administration, and so on. This model may be addressed either in genetically modified animals or in environmentally reprogrammed ones, that is, animal models of exposure to controlled environmental factors that may shift phenotypic expression. Current methods allow control of the impact of external factors from preimplantation stages to adolescence. For instance, it has been demonstrated that the *in vitro* culture of embryos (i.e. within *in vitro* fertilization technologies) may lead to different phenotypes depending on the presence of serum in the culture media (Fernández-González et al., 2004). Prenatal stress (maternal immobilization) or early postnatal stress (maternal deprivation) may produce long-term changes in the brain of rodents that resemble phenotypic alterations found in humans. A major effort is now focussed on identifying the key elements of such genetic–epigenetic alterations that accumulate during development of human pathologies. Major candidates for such silent phenotypic alterations include signalling systems that target either transcriptional regulation of genes relevant for development, neural proliferation or cell fate and survival. Additional targets include genes controlling neural plasticity and neurite connectivity. One such signalling system is the ECS, which has been described as being involved in main stages of neural development and activity.

Developmental aspects of the endocannabinoid system

The CB₁ cannabinoid receptor is a key component of the ECS, which consists of endogenous ligands called endocannabinoids, typically anandamide (AEA) and 2-arachidonylglycerol (2-AG), which act upon activation of cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂ receptors) as well as synthesizing and degrading enzymes and potential endocannabinoid membrane transporters. CB₁ receptor is the predominant cannabinoid receptor within the central nervous system, and is highly expressed in brain regions involved in emotional processing, motivation, motor activation and cognitive function (Mackie, 2005). In addition to cannabinoid receptors, which are the most-studied elements of the ECS, there are many other genes involved in endocannabinoid production and degradation whose role is only beginning to be understood. Some of these genes were specifically described as genes regulating axonal growth and guidance, such as diacyl glycerol lipase alpha, one of the major enzymes in 2-AG production (Bisogno et al., 2003; Goncalves et al., 2008). Genetic deletion of monoacyl glycerol lipase or ABHD6, two of the main enzymes degrading endocannabinoids, causes endocannabinoid overload, resulting in altered developmental phenotypes (for a review see Blankman et al., 2007; Lichtman et al., 2010; Marrs et al., 2010). Interestingly, the first inherited defect of endocannabinoid signalling described in humans has been reported recently and affects one of the enzymes, ABHD12 hydrolase, which degrades 2-AG. The defect produces the PHARC syndrome characterized by polyneuropathy, hearing loss, ataxia, retinitis pigmentosa, and cataract (Fiskerstrand et al., 2010), although further studies are needed to clarify the role of the endocannabinoid contribution to this syndrome.

Among the multiple functions of the ECS there is evidence for its role in neural development (Bermudez-Silva et al., 2010; Cota, 2008; Moreira and Lutz, 2008; Viveros et al., 2005a, 2005b, 2007; Wotjak, 2005), as well as its participation in the specification of connectivity patterns (Galve-Roperh et al., 2008; Mulder et al., 2008; Wu et al., 2010). Both CB₁ receptors and endocannabinoid ligands can be detected in the rat (Belue et al., 1995; Rodríguez de Fonseca et al., 1993) and human (Mato et al., 2003) brain during early developmental periods (Belue et al., 1995; Mato et al., 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 1993; Viveros et al., 2005a). In animal models, AEA content has been observed to gradually increase during early postnatal stages, reaching its maximum in the adolescent brain (Harkany et al., 2007). Similarly, in rat brain CB₁ receptors exhibit a mainly postnatal pattern of development, reaching maximal densities during adolescence which later drop to adult expression levels, as detected in the dorsal striatum (Belue et al., 1995; Rodríguez de Fonseca et al., 1993).

During the perinatal period, a common atypical pattern of CB₁ receptor expression has been found both in rodents and humans; high densities of CB₁ receptors have been observed in fibre-enriched areas that are practically devoid of them in the adult brain. This transient pattern of CB₁ receptor localization in white matter areas during the prenatal stages suggests a specific role of the ECS in neural development, which may

be important for guidance processes that result in the establishment of cortical-subcortical connections (Belue et al., 1995; Mato et al., 2003; Rodriguez de Fonseca et al., 1993). At early developmental stages, the ECS seems both to influence the appearance of key cellular signals and to modify the expression of genes that are relevant for neural development. These ECS-mediated actions also involve axonal growth, fasciculation and the establishment of correct neuronal connectivity (Fernandez-Ruiz et al., 2004; Harkany et al., 2007; Watson et al., 2008). In particular, during early phases of neuronal development, endocannabinoid signalling is integral for an array of processes including the proliferation and differentiation of progenitor cells, neuronal migration, axonal guidance, fasciculation, positioning of cortical interneurons, neurite outgrowth and morphogenesis (Harkany et al., 2007, 2008a, 2008b). The importance of the ECS during early developmental periods is further supported by the aberrations that occur following disruption of normal endocannabinoid signalling during ontogenetic phases. For example, pharmacological blockade of the CB₁ receptor in mid-to-late gestational periods impaired progenitor proliferation in the subventricular zone, disrupted axonal pathfinding and resulted in cortical delamination (Mulder et al., 2008), whereas, in utero exposure to Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) hampered appropriate interneuron positioning during corticogenesis and resulted in an increase in the density of CCK-positive interneurons in the hippocampus (Berghuis et al., 2005).

In humans, expression patterns of the CB₁ receptor have been found to increase dramatically from infancy to young adulthood in regions such as the frontal cortex, striatum and hippocampus (Mato et al., 2003). Rodent studies have provided further time- and region-specific data. We showed that the ontogeny of the receptors in rat striatum, limbic forebrain and ventral mesencephalon was relatively similar, exhibiting a progressive increase that peaks on days 30 or 40 and then subsequently decreases to adult values (Rodriguez de Fonseca et al., 1993). In the female hypothalamus, AEA levels are seen to peak at the onset of puberty and then decline into adulthood (Wenger et al., 2002). More recent studies have revealed clear developmental fluctuations throughout adolescence in endocannabinoid levels in the nucleus accumbens (NAcc) and prefrontal cortex (PFC), brain regions involved in reward, motivation, and cognition. The most profound alteration was the continuous increase in PFC AEA levels throughout the adolescent period; concentrations were almost three times higher in late than early adolescence. However, 2-AG concentrations were lower in the PFC in the later phases than in the beginning of the adolescent period, a finding paralleled in the NAc. In addition, CB₁ receptors were found to vary in the PFC and NAc core during the different phases of adolescence, although the alterations were less marked than for endocannabinoid levels. These findings emphasize dynamic alterations in endocannabinoid function in mesocorticolimbic regions of the adolescent brain that are relevant to reward and, to an even greater extent, cognition and emotional learning, and underscore the specific association of the ECS with neurodevelopment, not only for the perinatal period but also during adolescence (Ellgren et al., 2008). Whereas most data available in the literature refer to expression of protein or mRNA for brain CB₁ receptors, it would be

extremely interesting to examine the developmental changes of CB₁ receptor functional activity throughout these critical developmental periods. It is plausible that the neurodevelopmental and morphogenic roles of endocannabinoids somehow continue in adolescence, and it seems quite likely that disruption of normative endocannabinoid signalling during this time period has long-term functional consequences on adult brain function and behaviour. The implication of the ECS in brain developmental processes may explain the negative effects of cannabinoid consumption in adolescence on emotional and cognitive function, as well as cognitive deficits observed in children born to women who used marijuana during pregnancy (Mereu et al., 2003).

In our developmental study quoted above (Rodriguez de Fonseca et al., 1993), we found subtle sexual dimorphisms in the rat striatum and ventral mesencephalon but not the limbic forebrain, and we did not find significant differences in the expression of hippocampal CB₁ receptors among neonatal rats (Suarez et al., 2009). At adolescence (postnatal day (PND) 43), subtle differences in the expression of hippocampal CB₁ receptors were found, with female rats showing lower cannabinoid CB₁ receptor density when compared with males (Marco et al., 2007b). In contrast, clear sex differences in CB₁ receptors are evidenced in adult rats that have been described for both the expression and the functionality of hippocampal CB₁ receptor. Male rats show higher levels of hippocampal CB₁ receptor expression than females (Reich et al., 2009), whereas female rats exhibit a pattern of higher CB₁ receptor-mediated G protein activation in hippocampal formation when compared with male animals (Mateos et al., 2010). Thus, it seems likely that sexual differences in CB₁ receptor expression (at least in certain regions such as the hippocampus) are established beyond PND 40. Interestingly, however, differential effects of diverse kinds of stress on hippocampal CB₁ receptor expression of male and female rats have been found in both adult (Reich et al., 2009) and 13-day-old neonatal animals (Suarez et al., 2009), suggesting a role for organizational sex steroids during the perinatal period.

Interaction of early life stress with the endocannabinoid system

Impact of early stress

Evidence indicates that traumatic experiences during early developmental periods might be associated with psychopathology (such as depression or schizophrenia) and altered neuroendocrine function later in life (Levine, 2005; Moffett et al., 2007; Tyrka et al., 2008), and several experimental models have been developed in an attempt to mimic diverse types of early life stress. One of the multiple mechanisms by which these traumatic episodes affect brain development is the activation of stress responses including glucocorticoid receptors. Hormonal receptors are one of the most important targets for epigenetic alterations of the developmental programme. A main group of hormonal receptors are transcription factors regulating gene expression. There is much evidence that such receptors are involved in neurogenesis, neural fate, differentiation and survival. Loss or inappropriate secretion of these hormones often results in profound

alterations in brain circuitry, affecting motor development, sexual differentiation of the brain or cortical patterning (see McCarthy, 2008 for a review on oestradiol actions on neurodevelopment). Glucocorticoids, thyroid hormones and sex steroids are among the hormones found to regulate brain development, and all clearly affect the ECS (Asúa et al., 2008; Mailleux and Vanderhaeghen, 1993; Rodriguez de Fonseca et al., 1994). For instance, congenital hypothyroidism is associated with impaired expression of the cannabinoid CB₁ receptor in the striatum, resulting in hyperactivity. Administration of thyroid hormone to hypothyroid pups returns both spontaneous activity and CB₁ expression to normal levels (Asúa et al., 2008). As described in multiple observations, early life stress affects the ECS leading to alterations in emotional processing, stress responses, dopaminergic function, and so on (del Arco et al., 2000; Moreno et al., 2005; Rubio et al., 1995). We are beginning to unveil how stress impacts on the ECS and how its disruption affects permanently brain functions (Figure 1(B)). This example also serves to highlight the difficulties in finding appropriate controls for the developmental hypothesis, since minimal manipulations may severely affect certain brain functions, acting as confounding variables.

Maternal deprivation as a suitable animal model

One of the best-studied models of early life stress is maternal deprivation (MD). Notably, adult rats submitted to a 24-h episode of MD at PND 9 showed behavioural abnormalities that resembled psychosis-like symptoms, including disturbances in pre-pulse inhibition (PPI), latent inhibition and auditory sensory gating, and startle habituation. Regarding possible underlying neurochemical correlates, several neurotransmitters systems involved in mental disorders have been analysed. They include peptides such as neuropeptide Y (NPY), involved in affective disorders, or glutamate transmission through the N-methyl-D-aspartate receptor, hypothesized to be involved in positive and negative symptoms of schizophrenia (Labrie and Roder, 2010).

Adult MD animals showed reduced levels of NPY in the occipital cortex and hippocampal formation, and a significant reduction in hippocampal levels of calcitonin-gene-related peptide, polysialylated neural cell adhesion molecule and brain-derived neurotrophic factor, and a significant decrease in the mRNA levels of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR-2A and NR-2B. These changes are suggestive of a loss of synaptic plasticity and hypofunctionality of the glutamatergic system, as recently postulated for schizophrenia (for a review see Ellenbroek and Riva, 2003; Ellenbroek et al., 2004). In addition we have shown that, at adolescence, MD rats showed depressive-like behaviour, a trend towards increased impulsivity (Marco et al., 2007a) and altered behavioural, immune and endocrine responses to cannabinoid agonists such as WIN 55,212-2 (Llorente et al., 2007; Marco and Viveros, 2009). One of the most prevalent hypotheses for the pathogenesis of schizophrenia states that the disease is a neurodevelopmental disorder associated with early brain developmental abnormalities (Lewis and Levitt, 2002; Marek and Merchant, 2005; Weinberger, 1987). From this perspective, we expected that behavioural

deficits observed in mature MD animals might be related at least partially to altered neural development, possibly triggered by stress-induced increases in glucocorticoid levels. Some of these effects resemble those observed after pharmacological manipulation of glucocorticoid tone during late gestation and early lactation periods, indicating that glucocorticoid-derived actions may be mediating part of the response to MD. In fact, MD acutely leads to high levels of corticosterone (Suchecki et al., 1993) that remain elevated at PND 13 in MD male and female rats (Llorente et al., 2008; Viveros et al., 2009). In accordance with our hypothesis, we described sex-dependent alterations in developing hippocampal and cerebellar neurons and glial cells in MD neonatal rats, with males being more markedly affected. Changes included alterations of endocannabinoid levels, number of astrocytes and corticosterone levels (Llorente et al., 2008, 2009; López-Gallardo et al., 2008). These alterations appear to support our claim that MD neonatal stress may be a potential model to analyse neuropsychiatric symptoms with a basis in neurodevelopment.

Several lines of evidence support an association between an altered ECS and the pathogenesis of schizophrenia. For example, increases in CB₁ cannabinoid receptor expression have been found in the prefrontal cortex (Dean et al., 2001) and cingulate cortex (Zavitsanou et al., 2004) of schizophrenic patients. Also, elevated levels of the endocannabinoid AEA have been detected in the cerebrospinal fluid of schizophrenics (Giuffrida et al., 2004; Leweke et al., 1999, 2007). Moreover, frequent cannabis use significantly increases the risk for psychotic symptoms and schizophrenia (for a review see Di Forti et al., 2007; Leweke and Koethe, 2008). In addition, as indicated above, the ECS appears to play a major role in brain development. Based on the previously reported psychosis-like symptoms in adult MD animals and on our findings of cellular changes in relevant brain regions such as the hippocampus, we expected that MD might also induce alterations of the ECS. Our results confirmed that neonatal MD animals showed an increased level of the endocannabinoid 2-AG and a decrease in hippocampal CB₁ immunoreactivity. It is important to stress that findings in both human and animal models point to the participation of the ECS in the pathogenesis of schizophrenia (or behavioural phenotypes that serve as model of this disease). The nature of the changes (location, intensity, direction, etc) and the impact on cognitive and executive functions need to be addressed in depth, taking into account the important species differences that exist between rodents and humans.

These alterations were more marked in male animals (Suarez et al., 2009). Concordant with the increased 2-AG levels, we have found more recently that MD also induced a significant decrease in hippocampal monoacylglycerol lipase, the enzyme involved in the degradation of this endocannabinoid, as reflected by RT-PCR and immunohistochemistry. This decrease, again, was more marked in males than in females (Suárez et al., 2010). This sexual dimorphism was in agreement with our previous results showing that 13-day-old male rats were more affected than corresponding females regarding hippocampal neuronal and glial alterations (Llorente et al., 2008, 2009; López-Gallardo et al., 2008).

Moreover, two inhibitors of endocannabinoid inactivation (the fatty acid amide hydrolase inhibitor N-arachidonoyl-serotonin (AA-5-HT), and the endocannabinoid reuptake inhibitor, OMDM-2) modulated the above-indicated hippocampal cellular effects induced by the MD stress (Llorente et al., 2008). As a whole, these data support a clear association between neurodevelopmental stress and dysregulation of the ECS. This association may be relevant for schizophrenia and other neurodevelopmental psychiatric disorders. Moreover, we propose that the MD procedure may provide a relevant experimental model to further address the role of the ECS in brain development and its possible implications in neurodevelopmental mental illnesses such as schizophrenia. CB₂ receptors have been traditionally considered as peripherally located receptors, mainly expressed in immunological tissues. These receptors have also been found within the central nervous system on neurons and glial cells, but their expression was mainly related to conditions of inflammation. However, recent findings of brain CB₂ receptors under normal conditions suggest broader functional roles for these receptors in the central nervous system (for review see Mackie, 2008; Svizenska et al., 2008; Viveros et al., 2007). In our study on the effects of MD on cannabinoid receptors, we provided evidence for the presence of the CB₂ receptor in the hippocampus of neonatal rats of both sexes. Moreover, our data demonstrated that CB₂ receptors were clearly affected by the MD procedure: MD male and female animals showed a clear increase in CB₂ receptor immunoreactivity.

As we have seen, MD induces strikingly contrary patterns of changes on CB₁ and CB₂ receptors. The functional significance of such changes needs to be addressed, but suggests that there are functional links of some kind between both types of cannabinoid receptors with respect to the response to developmental challenges from the stress imposed by MD. Another difference regarding both receptors is that the CB₂ type was affected equally by MD in the two sexes, whereas CB₁ showed a clear sexual dimorphism with a more predominant decrease in the expression observed on MD males (Suarez et al., 2009). In view of recent reports on the presence of CB₂ receptors in diverse brain regions of adult rats and mice, and also considering the present findings, the functional roles of CB₂ receptors in the brain of naive rodents clearly deserve further investigation. Interestingly, there are several recent papers that suggest a role for CB₂ receptors in neuropsychiatric diseases (for review see Roche and Finn, 2010). For example, Ishiguro et al. (2010) described a polymorphism in the gene encoding for CB₂ receptors associated with schizophrenia in a Japanese population, and showed that administration of a CB₂ receptor antagonist worsened disruption of PPI induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 in rats (Ishiguro et al., 2010). The potential implication of a role for the CB₂ receptor in schizophrenia provides another possible mechanism by which cannabis use could affect psychoses such as schizophrenia. Moreover, studies in mice overexpressing cannabinoid CB₂ receptors indicated that increased CB₂ receptor expression significantly reduced depressive-related behaviours, suggesting that the CB₂ receptor could be a new potential therapeutic target for depressive-related disorders (García-Gutiérrez et al., 2010).

Adolescence as a critical neurodevelopmental period

In addition to the perinatal period, adolescence represents another critical developmental phase (Figure 1(A)) during which the nervous system shows a unique plasticity. During this period, the brain undergoes radical functional alterations that are associated with a high degree of plastic structural remodelling (Giedd et al., 1999; Gogtay et al., 2004; Jernigan et al., 1991; Paus, 2005; Pfefferbaum et al., 1994; Shaw et al., 2006; Sowell et al., 1999). Areas involved in planning and decision-making, including the prefrontal cortex – the cognitive or reasoning area of the brain important for controlling impulses and emotions – appear not to have yet reached adult dimensions during the early twenties. The brain's reward centre, the ventral striatum, is more active during adolescence than in adulthood, and the adolescent brain is still strengthening connections between its reasoning- and emotion-related regions (Sowell et al., 1999). It has been proposed that adolescence involves a shift from greater limbic to PFC control of behaviour, with an increase in the inhibitory connections between these two regions (Spear, 2000). These neural changes are believed to underlie a shift from behaviour that is driven by affective impulses to more regulated behaviour that is guided by consideration of future personal and social consequences (Nelson et al., 2005). Therefore these findings suggest that cognitive control over high-risk behaviours is still maturing during adolescence, making teens more apt to engage in risky behaviours. In fact, adolescence is defined by characteristic behaviours that include high levels of risk taking, exploration, novelty and sensation seeking, social interaction, activity and play behaviours. The ages associated with adolescence are commonly considered in humans to be approximately 12 to 20–25 years of age, and PND 28–42 in rodents (Adriani and Laviola, 2004; Spear, 2000). A 'window of vulnerability' appears to exist during the periadolescent period regarding the onset of certain neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and the effects of drugs of abuse, in particular cannabis (Adriani and Laviola, 2004; Fernandez-Espejo et al., 2009).

Sex-dependent long-term effects of adolescent exposure to cannabinoids

Although the rate of marijuana use among youths aged 12–17 has remained stable during recent years (6.7%), marijuana has been the illicit drug with the highest rate of dependence or abuse in recent years (SAMHSA, 2008). The increasing use of cannabis among adolescents and its associated public health problems have led to a parallel increase in basic research on appropriate animal models. Chronic administration of cannabinoid receptor agonists during the periadolescent period causes persistent behavioural alterations in adult animals. Some of these alterations may be related to a possible increased risk of psychosis and other neuropsychiatric disorders. As we will discuss in the next section, the early adolescent period is being identified as a phase of development particularly vulnerable to at least some of the adverse effects of exposure to cannabinoid compounds. For example,

Schneider and Koch (2003) showed that chronic pubertal treatment with the cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, resulted in impaired memory in adulthood, whereas if the chronic treatment with the drug was administered during adulthood, it did not lead to behavioural changes (Schneider and Koch, 2003). In another study, a 21-day treatment with the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in 30-day-old rats resulted in a lasting impairment of working memory (O'Shea et al., 2004) and, again, these later behavioural changes were observed in adolescent but not adult drug-treated rats. A more recent study performed in male rats has shown that pubertal, but not adult, chronic WIN 55,212-2 administration induced persistent disturbances in object and social recognition memory (indicating impairments in working memory and social memory, respectively) and led to social withdrawal and alterations in social behaviour and self-grooming. Furthermore, acute administration of WIN 55,212-2 induced more severe effects on behavioural performance in pubertal than in adult rats (Schneider et al., 2008). Exposure of male rats to chronic THC caused greater lasting memory deficits and hippocampal alterations in adolescent than adult rats (Quinn et al., 2008). In support of these experimental data, early onset cannabis users (who began smoking before age 17) exhibit poorer cognitive performance than late-onset users (who began smoking at age 17 or later) or control subjects, especially in verbal IQ (Pope et al., 2003). On the other hand, O'Shea et al. (2006) found that chronic exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 during perinatal, adolescent or early adulthood induced similar long-term memory impairments in male rats. To explain the different results with respect to their previous study performed in female rats (O'Shea et al., 2004, see above), they claimed that adult males might be more vulnerable than adult females to some detrimental effects of cannabinoids, such as cognitive effects. In line with this proposal, we have recently shown that, in the novel object recognition test, males were more vulnerable than females to the detrimental effects of a protocol of chronic adolescent administration of CP 55,940 (Mateos et al., 2010). Our results also indicated that in the object location task, only the females showed a significantly impaired performance in response to adolescent cannabinoid exposure (PND 28–43), suggesting that diverse aspects of memory function may be differentially affected in each gender (Mateos et al., 2010). Rubino et al. (2009) showed that a subchronic treatment with THC from PND 35–45 resulted, in adulthood (PND 75), in a worse performance in the radial maze, although no alteration was found in aversive memory (passive avoidance) (Rubino et al., 2009). Thus, it seems that the long-term residual effects of adolescent chronic cannabinoid exposure are gender and task dependent. The duration and onset of the treatments are also important factors that may affect outcomes, but it seems clear that, in all cases, the effects of cannabinoids on cognitive function are deleterious and can be observed after a long wash-out period.

Another important point concerns the specific composition of the plant ('cannabis brands'). Recent data suggest that Δ -9-THC and cannabidiol (CBD), the two main ingredients of the *Cannabis sativa* plant, can have opposite effects on certain regional brain functions, which may underlie their

different symptomatic and behavioural effects, and the potential ability of CBDs to somehow 'buffer' the detrimental (psychotogenic) consequences of THC (Bhattacharyya et al., 2010). A potential explanation for this interaction may be the recently described properties of CBD as an antagonist of CB₁ and CB₂ receptors (Thomas et al., 2007). In fact, the ratio of CBD and THC seems to have changed in an unfavourable manner in current 'cannabis brands'. This might underscore the higher risk of adverse (and long-lasting) consequences of marijuana consumption during adolescence. Nevertheless, more information is urgently needed in order to further clarify the extent to which CBD can in fact diminish the detrimental effects of THC, and which specific effects. A better understanding of the effects of CBD per se and in combination with THC requires more studies in which the drugs are administered chronically. This approach may also help to further clarify the potential therapeutic effect of CBD. In this regard animal models are a very useful tool.

Patterns of drug abuse have been recently reviewed (Greenfield et al., 2010). The rate of current illicit drug use is higher for males than for females. Accordingly, males are more likely than females to be past-month users of marijuana (7.9% vs. 4.4%). In spite of this fact, the rate of current use of marijuana among females has notably increased during recent years, while the rate has not changed significantly for males (SAMHSA, 2008). In agreement with findings in rodents, human studies also suggest the existence of gender differences as regards cannabis-induced cognitive impairment in young people (Pope et al., 1997), although much more research is necessary in evaluating sexual dimorphisms. It is very likely that the long-term cognitive effects of adolescent cannabinoid exposure are related to fewer synaptic contacts and/or less efficient synaptic connections throughout the hippocampus, and this could represent the molecular underpinning of the cognitive deficit induced by adolescent cannabinoid treatment (Rubino et al., 2009). Moreover, it is tempting to speculate that a differential effect on synaptic plasticity could be found depending on the gender of the animals in parallel with differential behavioural impact. A possible link between the impaired memory observed specifically in males pre-exposed to cannabinoids in the novel object test and the increased functional activity of their CB₁ receptors (Mateos et al., 2010) might be the CB₁-mediated inhibition of glutamatergic and GABAergic neurons involved in mnemonic circuits (Ferraro et al., 2009; Larkin et al., 2008; Viveros et al., 2007).

In addition to cognitive effects, other cannabinoid effects have been also shown to be sexually dimorphic. For instance, we addressed the behavioural features of adult rats which had been exposed to chronic treatment with CP 55,940 (0.4 mg/kg) during the juvenile period (from 35–45 days of age). We used a battery of tests which provide complementary data about diverse aspects of the spontaneous behaviour of the animals and their anxiety-related responses. In the holeboard test, CP 55,940-treated females showed decreased general motor activity, and a significantly increased head-dipping duration (an exploratory parameter). In contrast, males treated with CP 55,940 in the above-described juvenile period showed a significant decrease in exploratory activity, whereas their general motor activity was not modified. Our results also indicated that the animals treated with CP 55,940 in youth

(days 35–45) showed anxiolytic-like responses in adulthood, as measured in the plus-maze and in an illuminated open field (Biscaia *et al.*, 2003). However, the effects on anxiety-related responses appear to be dependent on the duration of the pharmacological treatment, and perhaps the test employed, since other authors, using different protocols and/or test of anxiety have reported long-term increases in anxiety as a result of adolescent cannabinoid exposure (Viveros *et al.*, 2005a). As for other types of emotional response, Rubino *et al.* (2008) demonstrated that chronic administration of THC in adolescent rats induced subtle but lasting alterations in the emotional circuit ending in depressive-like behaviour in adulthood, and that this effect was observed in female but not in male rats.

Chronic peripubertal cannabinoid exposure: an animal model for specific signs of psychosis

Cannabis is one of the most abused drugs among teenagers, and the maturational processes that occur during adolescence are likely to confer this age group a higher risk of suffering from adverse consequences of cannabinoid exposure. Cannabis consumption has been related to detrimental emotional and cognitive consequences. In particular, a great health concern has arisen given its association with depression (Degenhardt *et al.*, 2003) and with an increased risk of psychosis (Di Forti *et al.*, 2009; Fernandez-Espejo *et al.*, 2009). In this section, we will focus on cannabinoid-induced neuropsychiatric disorders, with special emphasis on psychotic symptomatology.

Based on a large amount of data from animal studies, an association between early and/or heavy chronic cannabinoid use and detrimental long-term consequences to those at risk for schizophrenia has been concluded. Prospective longitudinal epidemiological studies may provide evidence for a higher incidence of neuropsychiatric disorders in participants who have consumed cannabis during adolescence. However, the ultimate proof of a causal relationship between cannabis use and psychotic illness later in life would come from studies in which healthy young people were exposed to THC and followed-up until adulthood. Obviously, for practical and ethical reasons, such an approach is impossible. In fact, among many other important health risks, it is well known that cannabis induces harmful effects on cognitive function (Nordentoft and Hjorthøj, 2007; Solowij and Michie, 2007; Solowij *et al.*, 2002). On the other hand, such studies can be performed in animals under well-controlled conditions. Hence, such animal models can shed light on the underlying neurobiological mechanisms, and on the relationship between cannabis use and schizophrenia. A dysregulation of the ECS may be implicated in the pathogenesis of schizophrenia. The peripubertal period appears to be critical for the development of cannabinoid CB₁ receptors and endocannabinoid levels (Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1994; Wenger *et al.*, 2002). Therefore, it is conceivable that chronic interference by cannabis with the developing ECS during this critical time interval leads to severe and persistent

functional impairments (Schneider and Koch, 2007) that might reflect, at least in part, psychosis-related symptoms. Adolescent animal models have proven to be useful in analysing the association between adolescent cannabis use and the long-lasting development of psychotic symptoms. For example, chronic pubertal treatment with the cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, resulted in impaired memory in adulthood as well as in a disrupted PPI of the acoustic startle response and lower breakpoints in a progressive ratio operant behaviour task (Schneider and Koch, 2003). Since PPI deficits, object recognition memory impairments, and anhedonia/avolition are among the endophenotypes of schizophrenia, the authors of this study proposed chronic cannabinoid administration. More recently it was confirmed that chronic pubertal WIN 55,212-2 treatment induced a long-lasting PPI deficit in adult rats as well as persistent changes of neuronal activity assessed by c-Fos protein quantification in several brain regions under basic conditions and in response to dopaminergic drugs (Wegener and Koch 2009). Interestingly, chronic WIN 55,212-2-treated rats not only showed a higher baseline Fos IR in the NAcc, a key structure of the mesolimbic reward system, but within this region also responded differently to dopaminergic drugs. The change in neuronal activity may represent a neuronal correlate for the effects of pubertal WIN 55,212-2 exposure on behavioural alterations observed during adulthood, possibly affecting the adult organism's response to certain drugs of abuse (Wegener and Koch, 2009). As in the vast majority of these kind of studies, this one was performed in male rats. In the next section we will see that in fact adolescent exposure to cannabinoids results in increased responses to other drugs of abuse, with this effect showing clear sexual dimorphisms.

The CB₁ agonist CP 55,940 has been reported not only to impair PPI in rats but also auditory gating and neuronal synchrony in limbic areas such as the hippocampus and entorhinal cortex, as evaluated through theta field potential oscillations (Hajos *et al.*, 2008). It seems clear that, at least in rats, cannabinoid agonists impair auditory gating function in the limbic circuitry, supporting a connection between cannabis abuse and schizophrenia as evaluated through this animal model. As a whole, the data described above indicate that chronic pubertal cannabinoid treatment in rats results in long-lasting behavioural alterations reflecting certain characteristics of schizophrenia symptomatology, such as deficits in sensorimotor gating, impaired memory, reduced motivation and inappropriate and deficient social behaviour. In addition, sensorimotor gating deficits were able to be restored by acute injections of the typical antipsychotic haloperidol. Moreover, the atypical antipsychotic drug quetiapine is able to acutely restore deficits in social behaviour induced by developmental cannabinoid exposure, and even exert some persistent beneficial effects. All these data provide support and validity for the suitability of chronic pubertal cannabinoid administration as an animal model for aspects of psychosis and schizophrenia (Leweke and Schneider, 2011; Malone *et al.*, 2010). It would be very interesting to directly address possible sexual dimorphisms regarding increased risk of showing schizophrenic-like symptoms in adolescent animals exposed to cannabinoids.

Interactions between cannabinoids and other drugs of abuse

It is well known that, in adult rodents, cannabinoid receptor agonists induce biphasic effects on anxiety (Viveros et al., 2005b) that may depend on the dose and the action on amig-dalar–hypothalamic circuits involving corticotropin releasing factor (Rodriguez de Fonseca et al., 1996). However, when we evaluated the effects of the same cannabinoid agonist on the anxiety-related responses (plus-maze) of young 40-day-old male and female rats, the data indicated a different profile, suggesting that the anxiolytic response may be dependent on age. The most relevant result of these experiments was the lack of anxiolytic-like effects of CP 55,940, even at very low doses (0.1 mg/kg). On the other hand, the cannabinoid agonist induced anxiogenic-like effects at doses of 0.1 and 0.5 mg/kg, and females appeared to be more vulnerable than males to the anxiogenic effect of the drug (Viveros et al., 2005a). Nicotine and cannabis, which share some biological actions (including biphasic effects on anxiety), are used frequently in combination, particularly among adolescents and young adults, and therefore the study of their functional interactions is of special interest (Viveros et al., 2006). We were interested in the interactions of these drugs regarding possible synergistic or antagonistic effects in relation to anxiety, as this may help to understand one possible reason for, and consequences of, the simultaneous use of the two drugs. For example, students reported that they smoked tobacco to reduce the sedative effects of cannabis and to increase and prolong the rewarding effects of cannabis (Tullis et al., 2003). We addressed the effects of a subchronic treatment with nicotine upon acute anxiety-like responses to the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in adolescent rats of both genders. In males, the combination of sub-threshold doses of the two drugs resulted in a significant anxiogenic-like effect. On the other hand, females appeared to be more vulnerable to the anxiogenic effect of the cannabinoid, and this effect was antagonized by nicotine (Marco et al., 2006). The observed sexual dimorphism suggests that the combined use of nicotine and cannabis may have a very different effect on the emotional status of male and female adolescents, which might influence the pattern and motivations of its consumption.

According to the phenotypic causation (gateway) model, early initiation of cannabis use may be a risk factor for the consumption of other drugs of abuse (Lynskey et al., 2003), although the alternative ‘correlated liabilities’ model proposes that cannabis and other illicit drug use is influenced by correlated genetic and environmental factors (Agrawal et al., 2004). Here also, the use of animal models has been very useful in analysing possible neurobiological substrates for these interactions. Sex-specific patterns of consumption during all phases of drug addiction are well documented (for a review see Fattore et al., 2009). However, most of the experimental research in the field of drug abuse has been carried out on males. Ellgren et al. (2007), in a study performed on male rats, demonstrated that exposure to THC in adolescent animals produced an increase in heroin self-administration, preproenkephalin mRNA expression and the expression of met-enkephalin and mu-opioid receptors in adulthood. More recently we examined whether chronic periadolescent

exposure to the cannabinoid agonist CP 55,940 (0.4 mg/kg, PND 35–45) could exert sex-dependent effects on morphine self-administration and the endogenous opioid system in adult rats. Periadolescent cannabinoid exposure altered morphine self-administration and the opioid system in adult rats in a sex-dependent manner. CP 55,940 did increase the acquisition of morphine self-administration under the FR1 schedule in males but not females. In addition, adolescent CP 55,940 exposure decreased mu-opioid receptor functionality in the NAcc shell only in males (Biscaia et al., 2008). According to our results, decreased mu-opioid-coupled G-protein activity occurred in the NAcc shell of male rats exposed prenatally to THC, with no changes in the NAcc core or caudate putamen (Spano et al., 2007). Together, these data suggest that cannabinoid exposure in early stages of development and adolescence produces perdurable changes in mu-opioid receptor functionality that are specific to the NAcc shell, which is one of the brain regions most closely related to natural and drug-induced reward (Di Chiara, 2002). The direction of sex differences regarding long-lasting effects of adolescent cannabinoid exposure on self-administration of other drugs of abuse may depend on the specific nature of the drug. By using a similar (though not identical) protocol as the one employed regarding the effects of adolescent CP 55,940 on morphine self-administration (Biscaia et al., 2008), Higuera-Matas et al. (2008) analysed the long-term effects of a chronic treatment with the same dose of CP 55,940 during adolescence (0.4 mg/kg, P28–P38) on adult acquisition and maintenance of cocaine self-administration. During the acquisition phase, female CP 55,940-treated rats showed a higher rate of cocaine self-administration as compared with vehicle-treated females and males, whereas no differences were found between both male groups (Higuera-Matas et al., 2008).

Mechanisms underlying gender differences: brain sexual differentiation

The original organizational–activational hypothesis of brain sexual differentiation has inspired a multitude of experiments demonstrating that the perinatal period is a time of maximal sensitivity to gonadal steroid hormones. According to this hypothesis, exposure to steroid hormones early in development masculinizes and defeminizes neural circuits (structural changes), programming behavioural responses to hormones in adulthood. Upon gonadal maturation during puberty, testicular and ovarian hormones act on previously sexually differentiated circuits to facilitate expression of sex-typical behaviours (activational effects) (Handa et al., 2008; Schwarz and McCarthy, 2008). Recent data have shed new insights into the mechanisms underlying sex differences. Thus, it has been proposed that the adolescent brain, undergoing remodelling, is organized a second time by gonadal steroid hormones secreted during puberty. This second wave of brain organization would build on and refine circuits that were sexually differentiated during early neural development. If, in fact, steroid-dependent organization of behaviour occurs during adolescence, this prompts a reassessment of the developmental time-frame within which organizational effects

are possible (Schulz et al., 2009). As for the sexual dimorphisms affecting the ECS and its diverse psychophysiological implications (for a review see Viveros et al. 2010), the number of carefully controlled studies designed to assess the organizational (i.e. in utero, neonatal) and/or activational (i.e. acute) roles of gonadal steroids in initiating and maintaining the disparities is limited. This is particularly problematic for human studies, where developmental, circadian and/or menstrual changes in the hormonal milieu are rarely, if ever, accounted for in the proper way.

In animal studies, endocrine status can be more precisely controlled. We showed that cannabinoid CB₁ receptor density in the medial basal hypothalamus, and expression in the anterior pituitary, varies over the course of the oestrous cycle (Rodríguez de Fonseca et al., 1994) – with the lowest levels observed during oestrus – and, in the case of the latter, is higher in males than in females and is increased following ovariectomy in an oestrogen-reversible manner (Gonzalez et al., 2000). This also appears to be the case with regard to cannabinoid self-administration, as gonadally intact female rats exhibit a higher rate of acquisition and maintenance than gonadally intact males, while ovariectomy reduced the levels of self-administration (Fattore et al., 2007). This suggests that CB₁ receptor expression is sexually differentiated in a regionally specific way, and subject to acute activational suppression by oestrogen. While there is clearly a prevalence of sex/gender differences in diverse biological processes regulated by cannabinoids, more work needs to be done in order to further our understanding of how gonadal steroids organize these disparities during in utero and neonatal development, and maintain them throughout life. The ideal way to test for sex differences in a given cannabinoid effect is to perform direct comparisons between castrated male and female subjects.

Concluding remarks

Animal models have clearly demonstrated that the ECS is a relevant contributor to brain development. Disruption of its functioning in critical periods may lead to silent phenotypes of vulnerability to mental health problems. These alterations may be derived from genetic disruptions or environmental modulations that may lead to epigenetic alteration of the ECS, as revealed by early stress-induced alterations in methylation patterns of the cannabinoid CB₁ gene (Franklin et al., 2010). This work clearly shows how well-known developmental factors that account for enhanced incidence of major mental disorders may also modulate the ECS, or even produce their impairment through this signalling system.

The MD model has been shown to be instrumental in establishing this relevant role for the ECS. The importance of the ECS as a key target for epigenetic factors stresses the importance of controlling cannabis exposure during critical developmental periods, mainly in adolescence.

Funding

The authors' work has been supported by Red de Trastornos Adictivos UE-FEDER RD 06/0001/0000 and RD06/0001/1013 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo),

GRUPOS UCM-BSCH: Grupo UCM 951579, Plan Nacional sobre Drogas Orden SAS/1250/2009, Ministerio de Ciencia e Innovación: SAF2006-07523; BFU2009-10109; PI 07/1226 and Junta de Andalucía (grant UE-FEDER CTS-03324). Alvaro Llorente-Berzal has a predoctoral FPU grant. Ricardo Llorente has a contract funded by BFU2009-10109.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Adriani W and Laviola G (2004) Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol* 15: 341–352.
- Agrawal A, Neale MC, Prescott CA, et al. (2004) Cannabis and other illicit drugs: comorbid use and abuse/dependence in males and females. *Behav Genet* 34: 217–228.
- Asia T, Bilbao A, Gorriti MA, et al. (2008) Implication of the endocannabinoid system in the locomotor hyperactivity associated with congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 149: 2657–2666.
- Belue RC, Howlett AC, Westlake TM, et al. (1995) The ontogeny of cannabinoid receptors in the brain of postnatal and aging rats. *Neurotoxicol Teratol* 17: 25–30.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, et al. (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19115–19120.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, et al. (2010) The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav* 95: 375–382.
- Bhattacharyya S, Morrison PD, Fusar-Poli P, et al. (2010) Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology* 35: 764–774.
- Bisicaia M, Fernandez B, Higuera-Matas A, et al. (2008) Sex-dependent effects of periadolescent exposure to the cannabinoid agonist CP-55,940 on morphine self-administration behaviour and the endogenous opioid system. *Neuropharmacology* 54: 863–873.
- Bisicaia M, Marin S, Fernandez B, et al. (2003) Chronic treatment with CP 55,940 during the peri-adolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 301–308.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, et al. (2003) Cloning of the first SN1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163: 463–468.
- Blankman JL, Simon GM and Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14: 1347–1356.
- Cota D (2008) The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 20: 35–38.
- Crews F, He J and Hodge C (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86: 189–199.
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, et al. (2001) Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* 103: 9–15.
- Degenhardt L, Hall W and Lynskey M (2003) Exploring the association between cannabis use and depression. *Addiction* 98: 1493–1504.

- del Arco I, Muñoz R, Rodríguez de Fonseca F, et al. (2000) Maternal exposure to the synthetic cannabinoid HU-210: effects on the endocrine and immune systems of the adult male offspring. *Neuroimmunomodulation* 7: 16–26.
- Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 137: 75–114.
- Di Forti M, Morgan C, Dazzan P, et al. (2009) High-potency cannabis and the risk of psychosis. *Br J Psychiatry* 195: 488–491.
- Di Forti M, Morrison PD, Butt A, et al. (2007) Cannabis use and psychiatric and cognitive disorders: the chicken or the egg? *Curr Opin Psychiatry* 20: 228–234.
- Ellenbroek BA, de Bruin NM, van Den Kroonenburg PT, et al. (2004) The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult Wistar rats. *Biol Psychiatry* 55: 701–707.
- Ellenbroek BA and Riva MA (2003) Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clin Neurosci Res* 3: 297–302.
- Ellgren M, Artmann A, Tkalych O, et al. (2008) Dynamic changes of the endogenous cannabinoid and opioid mesocorticolimbic systems during adolescence: THC effects. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 826–834.
- Ellgren M, Spano SM and Hurd YL (2007) Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 32: 607–615.
- Fatemi SH and Folsom TD (2009) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 35: 528–548.
- Fattore L, Fadda P and Fratta W (2009) Sex differences in the self-administration of cannabinoids and other drugs of abuse. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl 1): S227–S236.
- Fattore L, Spano MS, Altea S, et al. (2007) Cannabinoid self-administration in rats: sex differences and the influence of ovarian function. *Br J Pharmacol* 152: 795–804.
- Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Nunez L, et al. (2009) Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 206: 531–549.
- Fernández-González R, Moreira P, Bilbao A, et al. (2004) Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5880–5885.
- Fernandez-Ruiz J, Gomez M, Hernandez M, et al. (2004) Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res* 6: 389–401.
- Ferraro L, Tomasini MC, Beggiano S, et al. (2009) Short- and long-term consequences of prenatal exposure to the cannabinoid agonist WIN55,212-2 on rat glutamate transmission and cognitive functions. *J Neural Transm* 116: 1017–1027.
- Fiskerstrand T, H'mida-Ben Brahim D, Johansson S, et al. (2010) Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: an inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am J Hum Genet* 87: 410–417.
- Franklin TB, Russig H, Weiss IC, et al. (2010) Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol Psychiatry* 68: 408–415.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, et al. (2008) Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des* 14: 2279–2288.
- García-Gutiérrez MS, Pérez-Ortiz JM, Gutiérrez-Adán A, et al. (2010) Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol* 160: 1773–1784.
- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, et al. (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 2: 861–863.
- Giedd JN, Keshavan M and Paus T (2008) Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci* 9: 947–957.
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, et al. (2004) Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology* 29: 2108–2114.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, et al. (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8174–8179.
- Goncalves MB, Suetterlin P, Yip P, et al. (2008) A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 38: 526–536.
- Gonzalez S, Bisogno T, Wenger T, et al. (2000) Sex steroid influence on cannabinoid CB(1) receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 260–266.
- Greenfield SF, Back SE, Lawson K, et al. (2010) Substance abuse in women. *Psychiatr Clin North Am* 33: 339–355.
- Hajos M, Hoffmann WE and Kocsis B (2008) Activation of cannabinoid-1 receptors disrupts sensory gating and neuronal oscillation: relevance to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 63: 1075–1083.
- Handa RJ, Pak TR, Kudwa AE, et al. (2008) An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Horm Behav* 53: 741–752.
- Harkany T, Guzman M, Galve-Roperh I, et al. (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 28: 83–92.
- Harkany T, Keimpema E, Barabas K, et al. (2008a) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol* 286: S84–S90.
- Harkany T, Mackie K and Doherty P (2008b) Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol* 18: 338–345.
- Higuera-Matas A, Soto-Montenegro ML, del Olmo N, et al. (2008) Augmented acquisition of cocaine self-administration and altered brain glucose metabolism in adult female but not male rats exposed to a cannabinoid agonist during adolescence. *Neuropsychopharmacology* 33: 806–813.
- Ishiguro H, Horiuchi Y, Ishikawa M, et al. (2010) Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 67: 974–982.
- Jernigan TL, Trauner DA, Hesselink JR, et al. (1991) Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence. *Brain* 114: 2037–2049.
- Labrie V and Roder JC (2010) The involvement of the NMDA receptor D-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 351–372.
- Larkin AE, Fahey B, Gobbo O, et al. (2008) Blockade of NMDA receptors pre-training, but not post-training, impairs object displacement learning in the rat. *Brain Res* 1199: 126–132.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, et al. (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 19–31.
- Levine S (2005) Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30: 939–946.
- Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, et al. (2007) Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res* 94: 29–36.
- Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, et al. (1999) Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 10: 1665–1669.
- Leweke FM and Koethe D (2008) Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addict Biol* 13: 264–275.

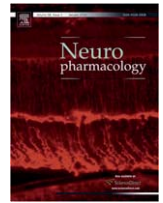
- Leweke FM and Schneider M (2011) Chronic pubertal cannabinoid treatment as a behavioural model for aspects of schizophrenia: effects of the atypical antipsychotic quetiapine. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 43–51.
- Lewis DA and Levitt P (2002) Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409–432.
- Lichtman AH, Blankman JL and Cravatt BF (2010) Endocannabinoid overload. *Mol Pharmacol* 78: 993–995.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, et al. (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 636–650.
- Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, et al. (2009) Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci* 27: 233–241.
- Llorente R, Llorente-Berzal A, Petrosino S, et al. (2008) Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Dev Neurobiol* 68: 1334–1347.
- López-Gallardo M, Llorente R, Llorente-Berzal A, et al. (2008) Neuronal and glial alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Dev Neurobiol* 68: 1429–1440.
- Lynskey MT, Heath AC, Bucholz KK, et al. (2003) Escalation of drug use in early-onset cannabis users vs co-twin controls. *JAMA* 289: 427–433.
- Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: Pertwee RG (ed.) *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer, 299–323.
- Mackie K (2008) Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol* 20(Suppl 1): 10–14.
- Mailleux P and Vanderhaeghen JJ (1993) Glucocorticoid regulation of cannabinoid receptor messenger RNA levels in the rat caudate-putamen. An in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 156: 51–53.
- Malone DT, Hill MN and Rubino T (2010) Adolescent cannabis use and psychosis: epidemiology and neurodevelopmental models. *Br J Pharmacol* 160: 511–522.
- Marco EM and Viveros MP (2009) The critical role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis: avoiding excess and deficiencies. *Mini Rev Med Chem* 9: 1407–1415.
- Marco EM, Adriani W, Canese R, et al. (2007a) Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86: 334–345.
- Marco EM, Granstrem O, Moreno E, et al. (2007b) Subchronic nicotine exposure in adolescence induces long-term effects on hippocampal and striatal cannabinoid-CB1 and mu-opioid receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 557: 37–43.
- Marco EM, Llorente R, Moreno E, et al. (2006) Adolescent exposure to nicotine modifies acute functional responses to cannabinoid agonists in rats. *Behav Brain Res* 172: 46–53.
- Marek G and Merchant K (2005) Developing therapeutics for schizophrenia and other psychotic disorders. *NeuroRx* 2: 579–589.
- Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, et al. (2010) The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* 13: 951–957.
- Mateos B, Borcel E, Loriga R, et al. (2010) Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB1 cannabinoid receptors. *J Psychopharmacol* 25: 1676–1690.
- Mato S, Del Olmo E and Pazos A (2003) Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur J Neurosci* 17: 1747–1754.
- McCarthy MM (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 88: 91–124.
- Mereu G, Fa M, Ferraro L, et al. (2003) Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4915–4920.
- Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, et al. (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73: 321–330.
- Moreira FA and Lutz B (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13: 196–212.
- Moreno M, Escuredo L, Muñoz R, et al. (2005) Long-term behavioural and neuroendocrine effects of perinatal activation or blockade of CB1 cannabinoid receptors. *Behav Pharmacol* 16: 423–430.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, et al. (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8760–8765.
- Nelson EE, Leibenluft E, McClure EB, et al. (2005) The social re-orientation of adolescence: a neuroscience perspective on the process and its relation to psychopathology. *Psychol Med* 35: 163–174.
- Nordentoft M and Hjorthøj C (2007) Cannabis use and risk of psychosis in later life. *Lancet* 370: 293–294.
- O'Shea M, McGregor IS and Mallet PE (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20: 611–621.
- O'Shea M, Singh ME, McGregor IS, et al. (2004) Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J Psychopharmacol* 18: 502–508.
- Paus T (2005) Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. *Trends Cogn Sci* 9: 60–68.
- Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, et al. (1994) A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol* 51: 874–887.
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Hudson JI, et al. (2003) Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? *Drug Alcohol Depend* 69: 303–310.
- Pope HG Jr, Jacobs A, Miale JP, et al. (1997) Evidence for a sex-specific residual effect of cannabis on visuospatial memory. *Psychother Psychosom* 66: 179–184.
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, et al. (2008) Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33: 1113–1126.
- Reich CG, Taylor ME and McCarthy MM (2009) Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. *Behav Brain Res* 203: 264–269.
- Roche M and Finn DP (2010) Brain CB2 receptors: implications for neuropsychiatric disorders. *Pharmaceuticals* 3: 2517–2553.
- Rodriguez de Fonseca F, Cebeira M, Ramos JA, et al. (1994) Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci* 54: 159–170.
- Rodriguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnín A, et al. (1993) Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4: 135–138.
- Rodriguez de Fonseca F, Rubio P, Menzaghi F, et al. (1996) Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe12,Nle21,38,C alpha MeLeu37] CRF attenuates the acute

- actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 56–64.
- Rubino T, Vigano D, Realini N, et al. (2008) Chronic [Delta]9-Tetrahydrocannabinol During Adolescence Provokes Sex-Dependent Changes in the Emotional Profile in Adult Rats: Behavioral and Biochemical Correlates. *Neuropsychopharmacology* 33: 2760–2771.
- Rubino T, Realini N, Braidà D, et al. (2009) Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19: 763–772.
- Rubio P, Rodríguez de Fonseca F, Muñoz RM, et al. (1995) Long-term behavioral effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol in rats: possible role of pituitary–adrenal axis. *Life Sci* 56: 2169–2176.
- SAMHSA (2008) *Results from the 2008 National Survey on Drug Use and Health: National Findings*. North Carolina, USA: US Department of Health and Human Services, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies.
- Schneider M and Koch M (2003) Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1760–1769.
- Schneider M and Koch M (2007) The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 180–186.
- Schneider M, Schomig E and Leweke FM (2008) Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol* 13: 345–357.
- Schulz KM, Molenda-Figueira HA and Sisk CL (2009) Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* 55: 597–604.
- Schwarz JM and McCarthy MM (2008) Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J Neurochem* 105: 1561–1572.
- Shaw P, Greenstein D, Lerch J, et al. (2006) Intellectual ability and cortical development in children and adolescents. *Nature* 440: 676–679.
- Solowij N and Michie PT (2007) Cannabis and cognitive dysfunction: parallels with endophenotypes of schizophrenia? *J Psychiatry Neurosci* 32: 30–52.
- Solowij N, Stephens RS, Roffman RA, et al. (2002) Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *JAMA* 287: 1123–1131.
- Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, et al. (1999) In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat Neurosci* 2: 859–861.
- Spano MS, Ellgren M, Wang X, et al. (2007) Prenatal cannabis exposure increases heroin seeking with allostatic changes in limbic enkephalin systems in adulthood. *Biol Psychiatry* 61: 554–563.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 417–463.
- Suarez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, et al. (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19: 623–632.
- Suárez J, Rivera P, Llorente R, et al. (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Res* 1349: 162–173.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, et al. (1993) Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57: 204–212.
- Svizenska I, Dubovy P and Sulcova A (2008) Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 501–511.
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, et al. (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150: 613–623.
- Tullis LM, Dupont R, Frost-Pineda K, et al. (2003) Marijuana and tobacco: a major connection? *J Addict Dis* 22: 51–62.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, et al. (2008) Childhood parental loss and adult hypothalamic–pituitary–adrenal function. *Biol Psychiatry* 63: 1147–1154.
- Viveros MP, Llorente R, Lopez-Gallardo M, et al. (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34(Suppl 1): S217–S226.
- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, et al. (2005a) Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacol* 16: 353–362.
- Viveros MP, Marco-López EM, López-Gallardo M, et al. (2010) Framework for sex differences in adolescent neurobiology: a focus on cannabinoids. *Neurosci Biobehav Rev*. In Press.
- Viveros MP, Marco EM and File SE (2005b) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 331–342.
- Viveros MP, Marco EM and File SE (2006) Nicotine and cannabinoids: parallels, contrasts and interactions. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 1161–1181.
- Viveros MP, Marco EM, Llorente R, et al. (2007) Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast* 25908.
- Watson S, Chambers D, Hobbs C, et al. (2008) The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci* 38: 89–97.
- Wegener N and Koch M (2009) Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res* 1253: 81–91.
- Weinberger DR (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44: 660–669.
- Wenger T, Gerendai I, Fezza F, et al. (2002) The hypothalamic levels of the endocannabinoid, anandamide, peak immediately before the onset of puberty in female rats. *Life Sci* 70: 1407–1414.
- Wotjak CT (2005) Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* 5: 659–670.
- Wu CS, Zhu J, Wager-Miller J, et al. (2010) Requirement of cannabinoid CB(1) receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. *Eur J Neurosci* 32: 693–706.
- Zavitsanou K, Garrick T and Huang XF (2004) Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 355–360.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats

Alvaro Llorente-Berzal^a, Virginia Mela^a, Erika Borcel^a, Manuel Valero^a, Meritxell López-Gallardo^b, Maria-Paz Viveros^{a,*}, Eva M. Marco^{a,**}

^a Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de CC. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), C/Jose Antonio Novais, n° 2, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2010

Received in revised form

9 July 2011

Accepted 19 July 2011

Keywords:

Animal models

Maternal deprivation

Adolescence

Antipsychotic

CB1 cannabinoid receptor

Sex differences

ABSTRACT

Early maternal deprivation (MD), 24 h of dam-litter separation on postnatal day (PND) 9, has been proposed as a suitable animal model to investigate some neuropsychiatric disorders with a base in neurodevelopment that also compromises metabolic and endocrine homeostasis. Atypical antipsychotics are frequently prescribed to children and adolescents as first-line treatment for several mental disorders despite the adverse metabolic effects frequently reported. However, persistent long-term effects after adolescent drug therapy have been scarcely investigated. In the present study we aimed to investigate the long-lasting metabolic and behavioral effects of MD in combination with the administration of an atypical antipsychotic, i.e. olanzapine, during adolescence.

For that purpose, male and female *Wistar* rats not exposed (control group, Co) and exposed to the MD protocol were administered with oral olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) or vehicle (Vh, 1 mM acetic acid) in drinking water from PND 28 to PND 49. Body weight gain, glycaemia and plasma triglyceride (TG) levels were evaluated as relevant metabolic parameters. MD significantly diminished body weight gain, while Olan administration only induced a subtle decrease in body weight gain among female animals in the long-term. Olan discontinuation decreased plasma TG levels in adult rats, an effect that was counteracted by neonatal exposure to the MD protocol. Both MD and Olan treatment impaired cognitive function in the novel object recognition test, although no interaction between treatments was observed. Neither MD nor Olan administration affected psychotic-related symptoms evaluated in the prepulse inhibition task, although animals treated with Olan showed an increased reactivity to the first acoustic stimulus. MD diminished the corticosterone stress-induced response among females, and reduced the expression of CB1 receptors in the hippocampus of both male and female rats. Notably, Olan administration tended to counterbalance these two MD-induced effects (i.e. corticosterone response and CB1 receptor expression).

Present findings provide evidence for the long-lasting effects of neonatal MD and Olan administration during adolescence, and suggest some sex-dependent interactions between these two protocols. Further research on the interactions between early life stress and antipsychotic drugs is urgently needed, and sex differences should be consistently considered both in animal models and in translation to human studies.

This article is part of a Special Issue entitled 'Schizophrenia'.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Early brain developmental abnormalities, often related to early traumatic experiences, have been extensively associated to

a wide range of psychopathologies, including schizophrenia (Levine, 2005; Lewis and Levitt, 2002; Tyrka et al., 2008). Consequently, several animal models have been developed in an attempt to mimic some of the neurobehavioral impairments of early life stress (Marco et al., 2011). In particular, early maternal deprivation (MD), 24 h of dam-litter separation on postnatal day (PND) 9, has arisen as a suitable animal model to investigate some neuropsychiatric disorders with a base in neurodevelopment (Ellenbroek et al., 2005; Marco et al., 2009; Viveros et al., 2009). At adulthood, maternally deprived animals showed

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4993; fax: +34 91 394 4935.

** Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4939; fax: +34 91 394 4935.

E-mail addresses: pazviver@bio.ucm.es (M.P. Viveros), emmarco@bio.ucm.es (E.M. Marco).

behavioral abnormalities that resemble psychotic-like symptoms (Ellenbroek and Riva, 2003) as well as a marked cognitive impairment (Llorente et al., 2011). Despite animal models for psychiatric diseases would never be able to entirely mimic the human pathology, they are highly valuable for the investigation of underlying neurobiological substrates and for the discovery of new pharmacological targets. Actually, maternally deprived animals exhibit neurobiological changes suggestive of a loss of synaptic plasticity and hypofunctionality of the glutamatergic system within the hippocampus (Ellenbroek and Riva, 2003; Llorente et al., 2011), impairments recently postulated for the etiopathogenesis of schizophrenia. An increased prevalence for metabolic disorders has been reported for schizophrenic patients, and, similarly, a disruption in metabolic homeostasis has been described among maternally deprived animals (Llorente et al., 2011; Viveros et al., 2010a,b). More recently, early maternal deprivation has been reported to alter the developing endocannabinoid system within the hippocampus (Llorente et al., 2008; Suarez et al., 2009, 2010). Thus, the investigation of the endocannabinoid system in this animal model becomes of great relevance given the pivotal role played by the endocannabinoid system in brain development (Anavi-Goffer and Mulder, 2009; Harkany et al., 2007) and in psychiatric disorders, including schizophrenia (Fernandez-Espejo et al., 2009; Muller-Vahl and Emrich, 2008).

Second-generation antipsychotics are frequently prescribed in children and adolescents as first-line treatment for schizophrenia and other mental disorders despite the metabolic adverse side effects often reported. Inadequate weight gain and obesity, hypertension, and lipid and glucose abnormalities are common metabolic side effects of great concern for the long lasting consequences of this drug therapy. Moreover, the particular vulnerability of young people to these metabolic side effects seems to predict adult obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular morbidity (see Findling et al., 2005; Vitiello et al., 2009 for reviews). Therefore, the evaluation of the long-term outcomes of early antipsychotic administration in animal models regarding endocrine and metabolic function becomes of increasing relevance. In addition, to the best of our knowledge few data on the cognitive consequences of antipsychotic treatment in children are currently available (Aman et al., 2008), and possible long-term effects have been scarcely investigated.

MD is a neurodevelopmental animal model suitable for the evaluation of psychiatric signs that also compromises metabolic and hormonal parameters. Oral administration of atypical antipsychotics provides a valuable model for the study of the long-term effects of these drugs administered at a critical window of brain development, i.e. adolescence. Thus, in the present study we aimed to investigate the long-lasting effects of MD in combination with a pharmacological therapy with an atypical antipsychotic, i.e. olanzapine, during adolescence. Given the gender differences described in schizophrenia and in antipsychotic responses (Abel et al., 2010) and the numerous sexual dimorphisms reported in the MD animal model (Viveros et al., 2009), rats of both sexes were considered in the present study. Therefore, herein we have investigated the long-term neurobehavioral and metabolic consequences of these two treatments, i.e., MD and adolescent Olan administration, in male and female *Wistar* rats. Body weight gain, glycaemia and plasma triglyceride levels have been evaluated as relevant metabolic parameters; cognitive function (novel object recognition), psychotic-related symptoms (prepulse inhibition response) and stress responsiveness (stress-induced corticosterone response) have been employed for the behavioral evaluation, and our attention has also focused on the expression of CB1 receptors within the hippocampus given the role played by the

endocannabinoid system in psychiatric disorders [see (Fernandez-Espejo et al., 2009; Muller-Vahl and Emrich, 2008) for review], and in metabolic homeostasis (Viveros et al., 2008). We expected present findings to open new avenues in the understanding of the persistent metabolic side effects of adolescent atypical antipsychotic administration in normal (control) subjects and in individuals with an increased vulnerability to psychopathology (MD animals).

2. Materials and methods

All the experiments performed in this study are in compliance with the Royal Decree 1201/2005, October 21, 2005 (BOE n° 252) about protection of experimental animals, in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in close agreement with a protocol approved by the local Animal Ethics Committee. In the present study, all efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.1. Animals

Experimental subjects were the offspring of albino *Wistar* male and female rats purchased from Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain) mated (one male \times two females) in our stabulary room approximately 2 weeks after their arrival. Animals were housed in Macrolon® III cages (50 \times 25 \times 14 cm). Ten days after, males were removed from the cages and dams were left singly housed until delivery. On the day of birth (postnatal day 0, PND 0), litters were sex-balanced and culled to 8 pups per dam (4 males and 4 females). At weaning (PND 22), animals were distributed in pairs of sibling animals of the same sex. A total of 96 rats coming from 12 litters were used. All animals were maintained at a constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 1\%$) in a reverse 12-h dark-light cycle (lights on at 20.00 h), with free access to food (commercial diet for rodents A04/A03; SAFE, Augy, France) and water.

2.2. Maternal deprivation

The maternal deprivation (MD) protocol took place on postnatal day, PND 9 as previously described (Llorente et al., 2007). In brief, on PND 9, half of the litters were submitted to 24 h of maternal deprivation, i.e. dams removed from their home-cages at 09.00 h and pups left undisturbed in their corresponding home-cage (in the same stabulary room) for 24 h, until PND 10, when dams were re-placed in their corresponding home-cages.

2.3. Drug

Olanzapine (Olan, Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada) was orally administered at a dose of 7.5 mg/kg/day in drinking water during the adolescent period, from PND 28 to PND 49. Olan solution was prepared according to Terry et al. (2008) and following Dr. Frost advice (personal communication). Olan stock solution was prepared at a concentration of 6.25 mg/ml in 0.1 M acetic acid, stored at 4°C and used within three weeks from preparation. Olanzapine was diluted with deionized (ultrapure) water (Milli-Q® Gradient A10 Biocel Synthesis, Millipore S.A., Molsheim, France). Liquid consumption was monitored daily, and the dose of the drug was adjusted daily on the basis of liquid consumption according to Terry et al. (2008). Control animals received acetic acid 1 mM (vehicle), since 0.1 M acetic acid solution was diluted with deionized (ultrapure) water (1:100). For water consumption monitoring, animals were provided everyday with an initial volume of 120 ml, measuring every day at the same hour the remaining amount of liquid by weighing the bottles. Freshly prepared solutions were provided everyday in plastic bottles wrapped with an opaque black plastic cover.

According to previous literature, the Olan dosage used in the present study achieved plasma levels generally considered therapeutic in humans (Terry et al., 2008; Prof. Frost, personal communication). Moreover, a similar dose range of Olan administration has been reported to produce D_2 receptor occupancies comparable to clinical occupancy levels (i.e., in the range 60–80%) (Kapur et al., 2003; Perez-Costas et al., 2008). Therefore, Olan administration (7.5 mg/kg/day in drinking water) in rats can be considered as a clinically comparable dosing regime.

2.4. Body weight control

Body weight was registered at PND 9 and PND 10, just before and by the end of the 24 h MD episode. Since animals were only identified after weaning (by a pen mark in the tail) the mean body weight of the male or female pups from a certain litter was used for the statistical analyses. Body weight was further registered during the pharmacological treatment, from PND 27 to PND 49, and once a week thereafter until PND 73. PND 27 was used as the reference value for the calculation of individual body weight increment.

2.5. Behavioral testing

2.5.1. Novel object test (NOT)

The novel object test (NOT) was performed as described by (Ennaceur and Delacour, 1988) with some modifications according to previous studies performed in our laboratory (Mateos et al., 2011). The apparatus was a squared arena (60 cm × 60 cm × 45 cm) with matte-painted metallic walls and a plastic-covered wooden floor. The test has 3 phases: *i) Habituation* to the arena (without objects) for 5 min per day during four consecutive days (from PND 56 to 59). The first habituation session was video recorded for subsequent registration of animals' behaviors by observation of the animal (RCV, Cibertec, Madrid, Spain) and to evaluate locomotor activity by video tracking (SMART version 2.5.20, Panlab, S.L.U., Barcelona, Spain); *ii) Training* (PND 60): animals were allowed to freely explore two identical objects (two plastic boxes, named as F1 and F2) until they had explored the objects for 30 s or a maximum period of 4 min; *iii) Test*: following an inter-trial interval of 4 h, animals were tested for novel object recognition (PND 60). During the test session, rats were allowed to freely explore one familiar object (F1 or F2) and a new object (metallic coloured box, N) for 3 min. In all sessions objects were placed in the back corner of the arena at a distance of 5 cm from the wall, and their position was randomly changed between the two opposite corners of the arena to avoid object and/or place preference. Each session started by placing the animals at the centre of the apparatus facing the opposite wall with respect to the objects. After each test session was completed, both the objects and the apparatus were carefully cleaned with a 20% ethanol solution.

Both training and test sessions were video recorded (Sony DCR-DVD310E) and the total time animals spent exploring the objects during sessions was subsequently registered (RCV, Cibertec, Madrid, Spain). The discrimination index (DI) was calculated as the difference between the time spent exploring the novel object (*N*) and the time spent exploring the familiar one (F1 or F2) by the total time spent exploring the two objects during the test session [$N - F / (N + F)$]. It has been previously reported that rats' tendency to discriminate between the familiar and the novel objects on the novel object recognition test diminishes after the first 2 min of the test trial (Dix and Aggleton, 1999; Mumby et al., 2002). In addition, during the first minute of the test session animals had explored the objects for more than the 50% of the total time of exploration. Therefore, the DI for the first minute was employed for the statistical analysis. Animals exploring less than 30 s during the training session and those exploring exclusively one of the objects during the test session were excluded from the analyses.

2.5.2. Prepulse inhibition (PPI)

The startle device consisted of a non-restrictive Plexiglas cage (28 × 16 cm × variable height) which encloses the sensor's platform but does not touch it. If the animal moves up or down, a transient force is developed on the platform. This transient force is measured at its peak, being the measure of the amplitude of the startle response. Startle movements of the rat were transduced by an accelerometer and the data was monitored through a computer by using the MONRS v2.0 software (Cibertec S.A., Madrid, Spain). The startle response was recorded during 100 ms following the pulse. The startle device was located in a sound-attenuating chamber (56 × 14 × 58 cm) constantly illuminated and equipped with a loudspeaker located in the top of the chamber.

Rats, at PND 70–71, were placed in the startle chamber for a 5 min habituation with a 65 dB white background noise. Then, 10 startle trials (120 dB, 20 ms in duration) were presented alone. Startle stimulus reactivity was considered as the magnitude of the startle response on the initial stimulus presentation thus providing a measure of startle reactivity uninfluenced by habituation and sensitization. For the PPI measure, animals were exposed to 10 blocks of five trials consisting on the exposure 1) to no startle stimulus (baseline activity, 65 dB), 2) to a startle stimulus alone (120 dB, 20 ms in duration), and 3) to a startle stimulus occurring 100 ms after the auditory prepulse (73, 75 or 80 dB, 20 ms in duration). The startle stimuli were presented at a variable inter-trial interval of 10–20 s and the occurrence of each trial type was semi-random with the restriction that each trial type had to occur in every five trial block. The cage was cleaned with a 20% ethanol solution between animals. The amount of PPI is expressed as the percentage (%) decrease in the amplitude of the startle response caused by presentation of the prepulse and was calculated according to the formula: $100 \times [(startle\ stimulus\ reactivity - startle\ stimulus\ reactivity\ in\ the\ presence\ of\ a\ prepulse) / startle\ stimulus\ reactivity]$ (Geyer and Swerdlow, 2001).

2.6. Stress-induced corticosterone response

Immediately after exposure to the PPI protocol, a blood sample was collected from the tail (Llorente-Berzal et al., 2011) in EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). Samples were centrifuged (3000 rpm, 15 min, 4 °C) and stored –30 °C until endocrine analyses. Corticosterone was measured using a solid phase ¹²⁵I radioimmunoassay (ImmuchemTM Corticosterone ¹²⁵I RIA kit for rats and mice, MP Biomedicals, Orangeburg, NY). The detection limit was 7.7 ng/mL and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were less than 10%.

2.7. Metabolic parameters: glycaemia and triglycerides levels

Blood samples were collected from the tail at PND 39 (during the pharmacological treatment) and at PND 49 (after cessation from the pharmacological treatment) in EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain) according to Llorente-Berzal et al. (2011). At PND 75, animals were sacrificed by decapitation and blood samples were collected from the trunk in 4 ml vacuum tubes with K₃ EDTA 7.2 mg (VACUTEST® KIMA slr, Arzergrande, Italy). Glucose levels were directly measured in blood samples by using Glucocard™ G-sensor (Arkray Factory Inc., Shiga, Japan). Blood samples were centrifuged (3000 rpm for 10 min) for plasma extraction and samples were stored at –30 °C until triglycerides level evaluation by using a colorimetric kit (RANDOX Laboratories Ltd., Antrim, UK). The test is linear up to 11.4 mmol/l (1000 mg/dl) of triglycerides concentration. All samples were run in duplicate.

2.8. CB1 receptor protein analysis

Animals were sacrificed by rapid decapitation at PND 80. Brains were rapidly extracted and bilateral hippocampi were dissected on ice, weighed and stored at –80 °C until their use. The tissue samples were homogenized at a ratio of 1:3 (w/v) in ice-cold lysis-buffer with protease inhibitors (Roche), and 20 µg of total protein were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Trans-Blot Transfer Medium). Blots were probed with rabbit polyclonal anti-cannabinoid CB1 receptor, diluted 1:250 (Thermo Scientific), and for loading control with monoclonal antibody anti-β-actin, diluted 1:750 (Sigma). Immunoreactive protein bands were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Bio Rad, Immun-Star HRP Chemiluminescent Kits) according to the manufacturer's instructions and quantified by densitometry using ImageJ software 1.43 × (NIH, USA).

Using the molecular mass marker as reference, the protein band we obtained was determined to correspond to a mass of approximately 20 kDa. This size is very close to that of 23 kDa reported by the supplier and Twitchell et al. (1997). The anti-CB1 receptor antibody used recognizes residues 1–77 of the CB1 receptor by Western blot; actually this antibody detects protein bands of ~23 kDa, ~60 kDa, ~72 kDa, and ~180 kDa from rat brain homogenate, all bands previously related to the cannabinoid receptor (the larger, 70-kDa species might reflect differential glycosylation and the lower M_r species may represent proteolytic fragments) (Twitchell et al., 1997). Despite in previous studies the most abundant protein species for CB1 are around 52–60 kDa (consistent with the monomeric CB1 species with various extents of glycosylation), several smaller and larger proteins bands are also reported and, in the present investigation, one of the proteolytic fragments of the CB1 receptor was detected (see for example Cichewicz et al., 2001; Egertova and Elphick, 2000; Grimsey et al., 2008; Shire et al., 1995). Western blot values were corrected using the internal membrane protein control of load β-actin (Fig. 6, panel A). The relative optical density of the blots from male control-vehicle (Co-Vh) group was used as reference (100%) and data of the other experimental groups were expressed as percentage referred to Co-Vh males.

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed using a three-way analysis of variance (ANOVA), with factors being sex (male or female), neonatal manipulation (Co or MD) and pharmacological treatment (Vh or Olan). To satisfy the assumption of normality for the ANOVA, data were transformed when necessary (i.e. rearing frequency was normalized by a rank-based transformation). In case a normal distribution could not be achieved by transforming the data, the Kruskal Wallis non parametric test was performed. Post hoc comparisons (Tukey) were performed with a level of significance set at *p* < 0.05. Additional ANOVAs split by one of the independent factors (sex or pharmacological treatment) were performed to further clarify the observed results. Statistical analyses were performed by the SPSS 17.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Body weight gain

As expected, the neonatal MD protocol significantly diminished body weight gain measured at PND 10 [$F(1,20) = 61.20, p < 0.001$] and at this early developmental stage no sex difference was evident for body weight gain. Control males and females gained weight from PND 9 to 10 (Control males increased in mean 3.62 ± 1.89 g and females 3.72 ± 1.94 g). However, 24 h of MD provoked a significant weight loss in both male and female rats (MD male lost in mean 0.81 ± 0.74 g and females 0.78 ± 0.14 g).

At the beginning of the pharmacological treatments, at PND 27 (Table 1) a significant overall effects of sex [$F(1,90) = 5.67, p < 0.05$]

Table 1
Body weight before the beginning of the pharmacological treatment.

	Males	Females
Control	74.1 ± 1.4	72.4 ± 0.9 ^a
Maternal deprivation	65.8 ± 1.0 ^b	62.5 ± 0.8 ^{a, b}

Animals' body weight (mean ± SEM) expressed in grams (g), at PND 27, before the beginning of the pharmacological treatment. $n = 24$ animals per experimental group. ANOVA ($p < 0.05$).

^a Main effect of sex.

^b Main effect of maternal deprivation.

and neonatal treatment [$F(1,90) = 74.45$, $p < 0.001$] were found. As expected, female rats exhibited lower body weights than males at this early age, and the protocol of MD significantly reduced body weight in both sexes.

During the pharmacological treatment (Fig. 1, panel A) a significant overall effect of age [$F(1,80) = 7491.30$, $p < 0.001$] was found. Sex differences were robust [$F(1,80) = 138.06$, $p < 0.001$], the neonatal treatment failed to induce a significant effect in the long-term [$F(1,80) = 3.18$, $p = 0.078$] and no differences in body weight gain were observed due to Olan administration. Males' growth rate was higher than females' during adolescence, and neither the neonatal manipulation nor the pharmacological treatment affected animals' weight gain profile during the drug administration period. Similarly, after discontinuation of the pharmacological treatment (Fig. 1, panel B) age [$F(1,86) = 2422.94$; $p < 0.001$] and sex [$F(1,86) = 763.83$; $p < 0.001$] clearly influenced body weight gain. Animals' growth was higher among males compared to females, but no major changes in body weight gain were observed as a consequence of MD or Olan administration. Only a minor effect

Table 2
General activity.

		Total ambulation (m)	Rearing frequency	Internal time (%)
Males	Co – Vh	13.3 ± 1.3	19 ± 4	3.3 ± 1.1
	Co – Olan	14.9 ± 1.1	26 ± 2	2.7 ± 0.6
	MD – Vh	16.7 ± 0.9	24 ± 3	5.8 ± 2.0
	MD – Olan	16.2 ± 1.0	31 ± 4	5.8 ± 1.4
Females	Co – Vh	19.0 ± 0.9 ^a	45 ± 4 ^a	5.0 ± 1.0 ^a
	Co – Olan	21.5 ± 1.4 ^a	45 ± 7 ^a	5.6 ± 1.2 ^a
	MD – Vh	20.2 ± 1.4 ^a	35 ± 3 ^a	4.4 ± 1.2 ^a
	MD – Olan	19.9 ± 1.4 ^a	38 ± 5 ^a	4.2 ± 1.0 ^a

Data are expressed as mean ± SEM from control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) and administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28 to 49). $n = 12$ per experimental group. ANOVA ($p < 0.05$).

^a Significant overall effect of sex.

following Olan discontinuation was reported in the long-term among females [at PND 67, $F(1,42) = 5.01$; $p < 0.05$; and at PND 73, $F(1,42) = 4.39$; $p < 0.05$] where a reduction in body weight gain was observed.

3.2. General activity

Regarding animals' general activity (Table 2) sex differences were achieved for motor-related parameters. A significant overall effect of sex was rendered for total ambulation [$F(1,88) = 32.28$, $p < 0.001$] and frequency of rearing [$F(1,88) = 34.08$, $p < 0.001$]. As expected, females displayed higher levels of motor (horizontal and vertical) activity than males. Significant interactions between sex

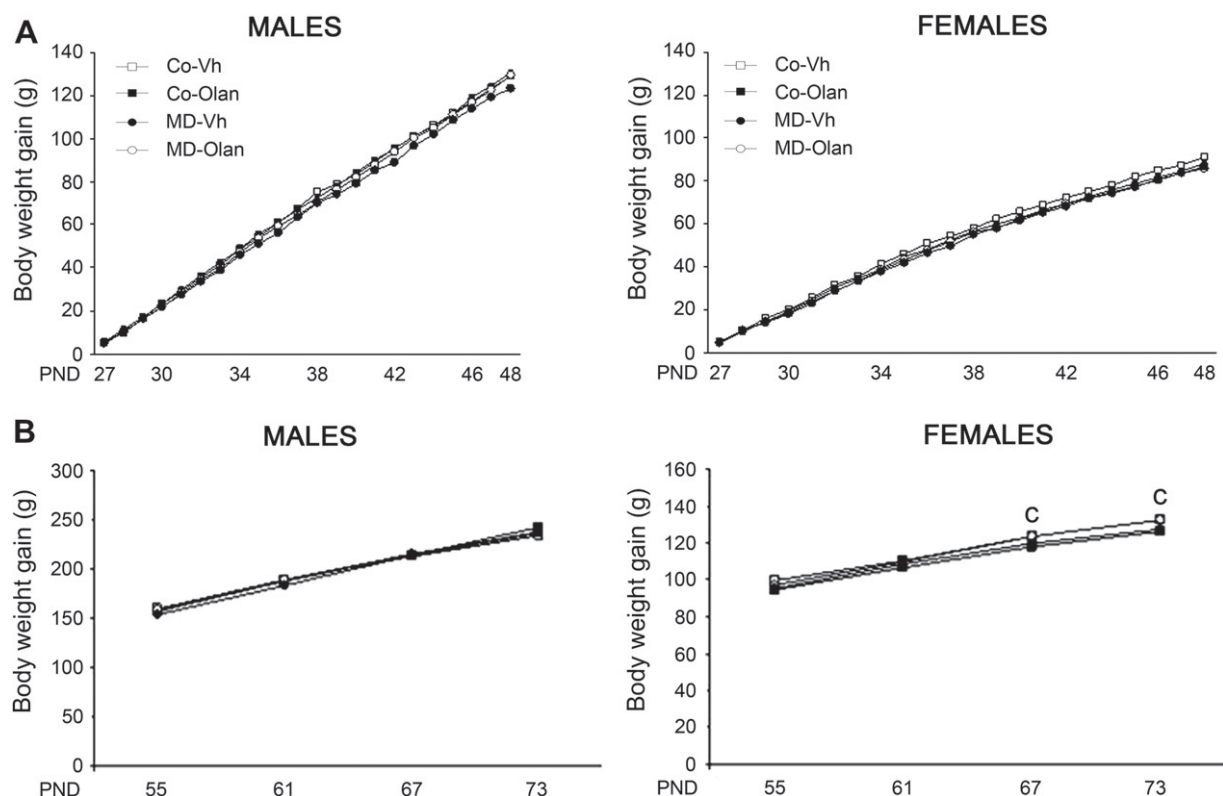


Fig. 1. Evolution of body weight gain of male (left panel) and female (right panel) rats during (A) and after (B) the administration of the pharmacological treatment. Body weight gain (mean ± S.E.M.) is expressed in grams (g) as the difference in body weight from each experimental day and PND 27, which was established as the reference day. Control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) were administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28 to 49). $n = 10$ – 12 animals per experimental group. ANOVA ($p < 0.05$), (c) significant overall effect of drug treatment.

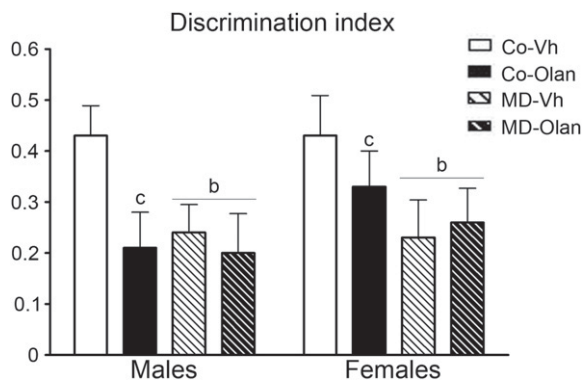


Fig. 2. Novel object test (NOT) performed on PND 60 (see text for details). Control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) were administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28–49). Histograms (mean \pm S.E.M.) represent the discrimination index (DI, see text for methodological details). Kruskal Wallis test ($p < 0.05$), (b) significant overall effect of MD; (c) significant overall effect of drug treatment among Co animals.

and neonatal treatment were achieved in the three-way ANOVAs of rearing frequency data [$F(1,88) = 4.33$, $p < 0.05$] and percentage of time spent exploring the interior of the arena [$F(1,88) = 4.69$, $p < 0.05$]. Further analyses split by sex revealed significant effects of the neonatal manipulation exclusively among males [total ambulation: $F(1,44) = 5.03$, $p < 0.05$ for males and $F(1,44) = 0.01$, n.s. for females; percentage of time spent exploring the interior of the arena: $F(1,44) = 4.25$, $p < 0.05$ for males and $F(1,44) = 0.79$, n.s. for females]. In males, MD induce increased levels of locomotor activity and time spent exploring the interior of the arena, thus possibly suggesting decreased levels of emotionality as a consequence of the neonatal episode of MD. Regarding the frequency of rearing, a significant main effect of the drug was found among males; that is, adolescent Olan administration seemed to have increased the frequency of rearing posture that may be not only an index of vertical motor activity, but may also be considered as a measure of exploratory activity.

3.3. Novel object test (NOT)

The NOT test was correctly performed since animals spent more time exploring the novel object than the familiar one during the first minute of the retention test (Mumby et al., 2002). The analysis of the DI (see Fig. 2) revealed a significant effect of MD on this memory index [$H(1) = 4.98$, $p < 0.05$], that is, animals neonatally exposed to the MD protocol showed a significant impairment in

recognition/short-term memory. Despite the Olan treatment failed to achieve a significant effect on the DI analysis [$H(1) = 1.95$, n.s.], Olan administration during adolescence seemed to decrease short-term memory among control animals [$H(1) = 4.36$, $p < 0.05$], although no such an effect was observed among MD rats.

3.4. Prepulse inhibition

Analysis of the startle stimulus reactivity (Fig. 3, panel A), considering body weight as a covariate, revealed a significant sex *per treatment* interaction [$F(1,69) = 6.05$, $p < 0.05$]. Olan tended to increase startle reactivity exclusively among males [$F(1,35) = 3.87$, $p = 0.057$] without any influence of previous life events.

When analyzing MD effects on PPI, and its possible interactions with the adolescent treatment with Olan, the prepulse intensity was included as a repeated measure in the ANOVA. Prepulse intensity significantly affected the percentage decrease in the amplitude of the startle response [$F(2,138) = 62.55$, $p < 0.001$]. No significant overall effects or interactions were found for sex, neonatal manipulation and/or pharmacological treatment. Thus, under our experimental conditions, no differences in sensorimotor gating seemed to arise as a consequence of the exposure to the early MD or the administration of Olan during adolescence (Fig. 3, panel B).

3.5. Metabolic parameters

Plasma glucose and triglycerides levels were determined during Olan administration (PND 39), at the end of the drug treatment (PND 49), and by the end of the experimental procedure (PND 75).

3.5.1. Glycaemia

Plasma glucose levels, in Table 3, changed along development [age: $F(2,154) = 20.55$, $p < 0.001$]. A significant sex effect was found [$F(1,77) = 33.59$, $p < 0.001$] with males presenting higher plasma glucose levels than females, no matter the age. No statistical differences due to the neonatal or the pharmacological treatments were found at any postnatal day.

3.5.2. Triglycerides levels

A significant effect of age was found [$F(2,146) = 39.24$, $p < 0.001$]. Triglycerides (TG) levels decrease as a function of age. No other significant effects were found. However, independent analyses at each time point indicated that adolescent Olan administration induced a long-lasting (PND 75) decrease in plasma TG levels among both male and female control animals, while an opposite effect (i.e. increase in TG levels) was observed as a consequence of Olan treatment among MD animals (Fig. 4).

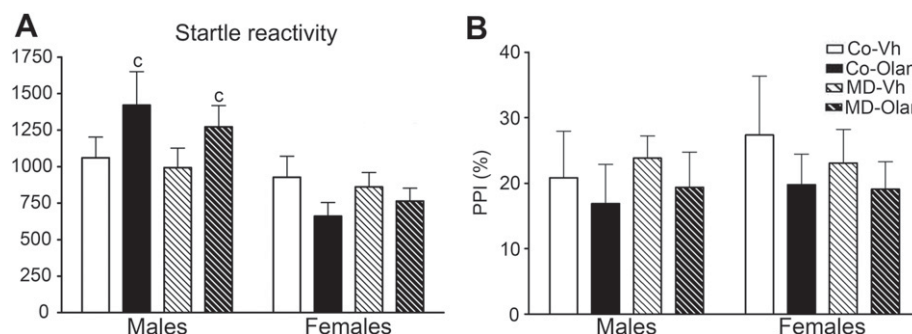


Fig. 3. Prepulse inhibition test (PPI) performed on PND 70–71 (see text for details). A. Startle reactivity (mean \pm S.E.M.) and B. Averaged prepulse inhibition (PPI) index to three different pre-pulse intensities (73, 75 and 80 dB) (mean \pm S.E.M.). Control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) were administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28–49). ANOVA ($p < 0.05$), (c) significant overall effects of drug treatment.

Table 3
Plasma glucose levels.

		PND 39	PND 49	PND 75
Males	Co – Vh	109.7 ± 2.5	115.1 ± 2.5	95.3 ± 4.0
	Co – Olan	110.6 ± 5.2	115.2 ± 5.1	101.1 ± 3.5
	MD – Vh	107.9 ± 3.0	116.3 ± 2.4	98.8 ± 4.2
	MD – Olan	110.3 ± 1.9	108.9 ± 2.8	101.6 ± 2.7
Females	Co – Vh	101.8 ± 2.4	101.8 ± 3.2	92.2 ± 3.8
	Co – Olan	103.4 ± 2.7	101.8 ± 2.4	95.6 ± 5.1
	MD – Vh	98.7 ± 4.0	97.4 ± 3.3	89.4 ± 5.5
	MD – Olan	102.8 ± 3.4	99.0 ± 3.0	96.1 ± 5.4

Plasma glucose levels (mean ± SEM), expressed as mg/dl, from control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) and administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28–49). $n = 9–12$ per experimental group. ANOVA ($p < 0.05$), a significant overall effect of sex was revealed (see text for details).

3.6. Circulating corticosterone levels

Plasma corticosterone levels after exposure to the prepulse inhibition protocol, that includes stressful noise stimuli previously reported to activate the HPA axis (Britton et al., 1992; Patz et al., 2006), are shown in Fig. 5. As expected, a clear sexual dimorphism was found for circulating corticosterone levels [$F(1,74) = 181.82$, $p < 0.001$] with females exhibiting higher plasma corticosterone levels than males. Significant overall effects were also achieved for both the neonatal manipulation [$F(1,74) = 9.19$; $p < 0.01$] and the pharmacological treatment [$F(1,74) = 5.46$, $p < 0.05$]. The corticosterone response to noise stress (i.e. exposure to the prepulse inhibition protocol) was reduced among MD animals, but such an effect was absent in animals administered with Olan at adolescence. A more in detail analyses of this endocrine parameter indicated that the neonatal and pharmacological treatment did not interfere with the corticosterone response to stress in males while exclusively affecting the endocrine response to stress among females [neonatal manipulation: $F(1,34) = 7.33$, $p < 0.05$, pharmacological treatment: $F(1,34) = 5.12$, $p < 0.05$]. In particular, post-hoc comparisons indicated that the corticosterone levels of maternally deprived females were significantly lower than hormone levels of control females, and the Olan treatment showed a strong tendency to counteract such effect ($p = 0.05$).

3.7. CB1 receptor protein levels

Western blot assays were performed to evaluate the relative amount of CB1 receptor in whole hippocampal homogenates of

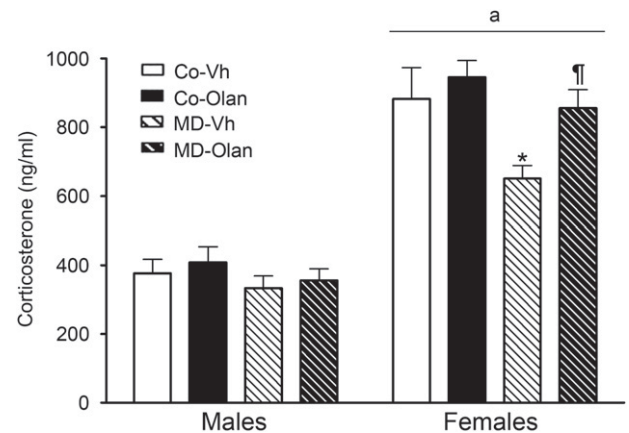


Fig. 5. Corticosterone response to stress. Histograms (mean ± S.E.M.) represent plasma corticosterone levels following exposure to the PPI protocol in control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) and administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28 to 49). $n = 8–12$ per experimental group. ANOVA ($p < 0.05$), (a) significant overall effect of sex; Tukey post-hoc comparisons: * $p < 0.05$ vs Co-Vh; † $p < 0.05$ vs MD-Vh from the same sex group.

each of the experimental groups. The three-way ANOVA rendered a significant effect of the interaction between neonatal manipulation and pharmacological treatment [$F(1,40) = 7.71$, $p < 0.01$]. Additional analysis revealed a significant effect of the neonatal manipulation among vehicle treated animals [$F(1,20) = 16.08$, $p = 0.001$] whereas no relevant effect was observed in Olan treated animals. Therefore, present analysis revealed a reduction in the expression of CB1 receptor protein in the hippocampus as a consequence of the MD protocol in vehicle-treated animals (Fig. 6, panel B) and such an effect was no longer observed in animals administered with Olan during adolescence. Thus, Olan seemed to counteract the MD-induced decrease in hippocampal CB1 receptor protein expression.

4. Discussion

Schizophrenia is a neuropsychiatric disorder with a neurodevelopmental origin whose symptoms usually manifest after puberty. A wide range of cognitive domains are compromised in this illness, as well as emotionality and stress responsiveness.

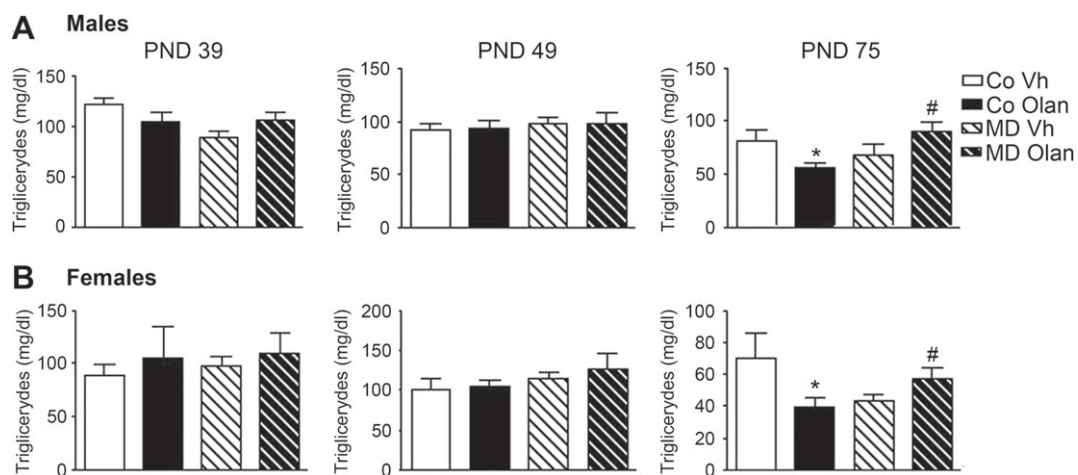


Fig. 4. Triglyceride levels. Histograms (mean ± S.E.M.) represent the plasma concentration of triglycerides (mg/dl) from control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) and administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28 to 49). $n = 8–12$ per experimental group. Tukey post-hoc comparisons: * $p < 0.05$ vs Co-Vh; # $p < 0.05$ vs Co-Olan from the same sex group.

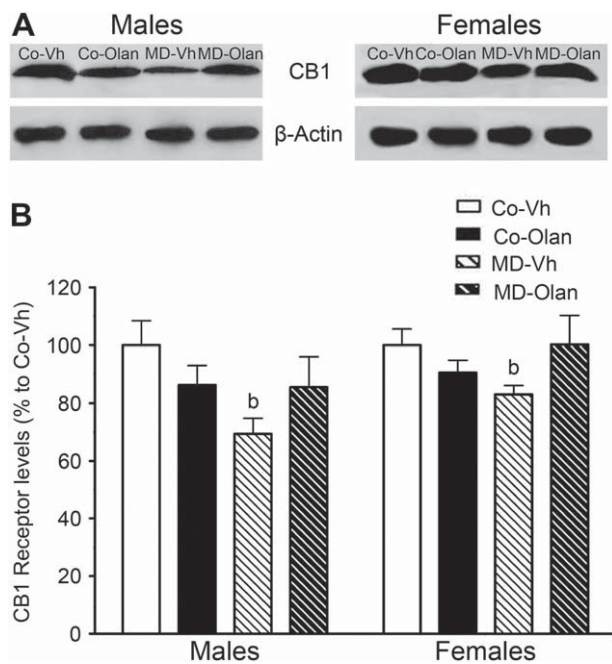


Fig. 6. CB1 receptor expression within the hippocampus. A. Representative Western blot immunoassay of CB1 receptor protein from whole tissue homogenates of the rat hippocampus from the different experimental groups: control (Co) or animals exposed to the early maternal deprivation protocol (MD, 24 h at PND 9) and administered with vehicle (Vh) or olanzapine (Olan, 7.5 mg/kg/day) during adolescence (from PND 28–49) (see text for methodological details). B. Quantification of CB1 receptor. Histograms (mean \pm S.E.M.) represent the percentage of the relative change in blots' optical density from male control-vehicle (CoVh) group. $n = 6$. ANOVA ($p < 0.05$), (b) significant overall effect of MD.

Present findings suggest that early MD may represent a useful tool to investigate some (although not all) behavioral impairment with a neurodevelopmental origin that might be accompanied by metabolic and endocrine disorders.

In accordance with previous studies (Llorente et al., 2011), MD induced a remarkable impairment of recognition memory among adolescent animals in the novel object test, proposed as a useful animal tool to assess cognitive dysfunction (Neill et al., 2010). In this regard, deficits in recognition memory have been described in several animal models of psychopathology based on the neurodevelopment hypothesis, such as maternal separation (180 min from PND 2 to PND 21) (Aisa et al., 2008) and prenatal immune challenge (Ito et al., 2010). Despite atypical antipsychotics have been reported to attenuate cognitive deficits in animal models relevant to psychiatric diseases (Neill et al., 2010) we failed to observe a reversal in the cognitive impairment induced by MD by Olan administration. In contrast, Olan administration during adolescence in our rats induced a deleterious effect in the novel object recognition test, particularly among male animals. In fact, atypical antipsychotics, including Olan, have been reported to impair cognitive function following acute and chronic administration in some rodent studies (Didriksen et al., 2006; Levin et al., 2005; Skarsfeldt, 1996; Terry et al., 2008). However, antipsychotic agents have been reported to be either neutral or deleterious to cognitive function in healthy individuals, although improvements have been observed in impaired individuals (Marston et al., 2009). Understanding the neural mechanisms at the basis of the cognitive impairment observed in MD animals would shed light on possible new targets for the management of cognitive dysfunction in schizophrenia, and/or in other psychopathologies with a neurodevelopmental origin. Moreover, discrepancies on the efficacy of

atypical antipsychotics in this (MD) and other animal models as well as in human studies may reflect differences in the ethiopathology of such disorders that might be worth investigating.

PPI has been widely used as a measure of sensorimotor gating, and deficient PPI has been reported in a number of neuropsychiatric disorders [see Li et al., 2009 for review]. In this regard, PPI disruptions have been previously reported as a consequence of MD (Ellenbroek and Cools, 2002), although present and previous experiments (Llorente-Berzal et al., in press) failed to show such impairments in PPI performance. PPI has been claimed to be strain-specific [see for example Drolet et al., 2002; Weber and Swerdlow, 2008], and evidence for and against PPI independency of the baseline startle reaction is presently available (Csomor et al., 2008; Millstein et al., 2006; Pietropaolo and Crusio, 2009). MD impairments in PPI may depend upon strain and/or substrains as well as upon baseline startle responsiveness tightly related to animals' emotional status. Furthermore, post-weaning handling has been reported to prevent and/or attenuate the isolation rearing-induced deficits in PPI (Krebs-Thomson et al., 2001; Rosa et al., 2005), thus an influence of the handling required to perform our experimental protocol, i.e. daily body weight control and behavioral testing (NOT), may have affected the behavioral response observed in PPI. Olan administration during adolescence did not modify PPI response, although a sex-dependent effect on the startle response was observed, Olan administration augmented startle reactivity exclusively among males. Since no deficit in PPI was observed due to the MD protocol, no Olan effects were expected in control or MD animals (Geyer et al., 2001).

Previous studies have reported impairments in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis as a consequence of a MD episode (Levine et al., 1991). Particularly, MD seem to render adults less responsive to a mild stress in a sex-dependent manner (Suchecki and Tufik, 1997). Accordingly, a decrease in the stress-induced corticosterone response (i.e. exposure to PPI) was observed among adult females early exposed to the MD protocol. Sex differences in stress responsiveness might be influenced by sex hormones, reported to be modified by this MD protocol (Viveros et al., 2010b, 2009), and also by additional changes in endocrine systems since early MD has been proposed to compromise the development of hypothalamic circuitries (Oomen et al., 2009; Schmidt et al., 2006; Viveros et al., 2010a,b). Regarding the pharmacological treatment, Olan was devoid of effects in the stress-induced corticosterone response in control animals while normalizing the MD-induced decrease in corticosterone response.

In the present study, MD has induced a persistent reduction in the expression of CB1 receptors within the hippocampus. Previous experiments have pointed at the hippocampus as a brain region particularly sensitive to the MD effects (Llorente et al., 2007, 2009; Roceri et al., 2002), and changes in the endocannabinoid system have also been reported (Suarez et al., 2009, 2010), particularly a decrease in CB1 receptor immunoreactivity in fibers within CA1 and CA3 hippocampal brain regions at PND 13 (Suarez et al., 2009). Despite the existing controversy on the role of the hippocampus in object-recognition memory (Mumby, 2001), some authors have provided support for the conclusion that the hippocampal region is important for recognition memory [see Broadbent et al., 2004; Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004 as examples]. Given the central role played by the hippocampal cannabinoid system in cognitive function (Riedel and Davies, 2005), we suggest that the MD-induced impairment in recognition memory may be related to the reported decrease in CB1 receptor expression within the hippocampus. However, the cognitive deficit observed as a consequence of the adolescent Olan administration was not accompanied by changes in hippocampal CB1 receptor expression. Therefore, differential neural mechanisms for the reported cognitive disruption might be hypothesized. No effects of atypical

antipsychotics on CB1 receptor expression within the hippocampus have been previously observed, although other brain areas have been reported to be affected, i.e. nucleus accumbens (Sundram et al., 2005) and forebrain regions (Wiley et al., 2008). However, adolescent Olan administration seemed to have attenuated the MD-induced changes in hippocampal CB1 receptor expression. Such an observation might result from a disruption in the normative developmental trajectories of the endocannabinoid system at the adolescent age, when maturational processes are still occurring, by Olan administration. Further investigation on the long-lasting neurobehavioral consequences of atypical antipsychotics is an issue of major health concern.

Last but not least, MD induced a decrease in body weight gain in both male and female animals that lasted from the day after deprivation, PND 10, until the beginning of adolescence, PND 27. No longer were differences in body weight gain observed in the present experiment. This MD-induced decrease in body weight gain was not accompanied by changes in glucose or triglyceride plasma levels measured at different time points. Previous studies have reported enduring changes in body weight gain as a consequence of the MD protocol (Llorente et al., 2007; Viveros et al., 2009) as well as long-term decreases in leptin and adiponectin circulating levels (Viveros et al., 2010a). Despite the lack of evidence from present findings, the MD protocol has been proposed to affect the development of hypothalamic circuitries involved in metabolic homeostasis and food intake regulation (Viveros et al., 2010b), thus providing a suitable animal model for the investigation of metabolic disorders with a neurodevelopmental origin. An increase in body weight gain has often been reported as a consequence of adult Olan administration (Shobo et al., 2011; Stefanidis et al., 2009; Weston-Green et al., 2010), with male rats being less sensitive than females to the Olan-induced effects in weight gain (Albaugh et al., 2006; Pouzet et al., 2003). In the present study females were indeed more sensitive to the Olan-induced effects on body weight gain, although such effects were in the opposite direction, that is, a reduction in body weight gain in the long-term. Discrepancies between present and previous results may rely on differences in age of treatment (i.e. adolescence), Olan dosage (7.5 mg/kg/day) and/or animal strain (*Wistar* rats). Indeed, most of the studies aimed at investigating Olan-induced metabolic adverse side-effects have employed *Sprague–Dawley* rats (not *Wistar*) as experimental subjects and have focused in adult drug administration (not adolescent). In humans, vulnerability to Olan-induced body weight gain seems to have a genetic base, and an influence of several polymorphisms have been recently described (Ellingrod et al., 2007; Laika et al., 2010). Our results do not show Olan-induced body weight gain, thus suggesting that the present protocol of adolescent Olan administration in drinking water may not be suitable to investigate the considerable weight-gain observed following Olan administration. Discontinuation of Olan administration diminished levels of plasma TG levels in the long-term (at PND 75) among control animals, but not in MD ones. Present findings suggest an altered metabolic status in MD animals (i.e. changes in body weight gain) although no changes in glucose or lipid metabolism could be detected. However, consequences of adolescent Olan administration differed between control and MD animals, thus indicating that this neonatal stress might have altered neural and/or endocrine targets of Olan function. Additional metabolic parameters, such as fat accumulation, and endocrine mediators of feeding behavior deserves further investigation.

5. Conclusions

Present findings provide evidence for MD as a valuable animal model for the investigation of some aspects of metabolic and behavioral disorders with a developmental origin. Cognitive

function and body weight gain are critically impaired in MD animals, although no changes in sensorimotor gating were observed. Herein, MD was also employed as a suitable tool to investigate the long-lasting consequences of adolescent antipsychotic administration. Despite further investigation on the interactions between MD and antipsychotic administration is urgently needed, present data indicate that chronic Olan administration during adolescence successfully attenuated some detrimental effects of MD, i.e. the decrease in hippocampal CB1 receptor expression, as well as the diminished stress-induced corticosterone response observed in MD females. Animal models of psychiatric disorders, such as MD, are essential for the investigation of the neural basis of functional impairments that are also observed in psychiatric patients. The evaluation of the efficacy of existing and/or novel drugs (i.e. Olan) once the disorder has emerged is one of the utilities of these animal models. In turn, prevention strategies in the field of psychiatry may also benefit from animal models. Indeed, the administration of antipsychotic drugs during adolescence has been reported to prevent the emergence of brain structural changes in a different neurodevelopmental animal model of schizophrenia (Piontkewitz et al., 2009). In conclusion, further investigation on the interactions between early life stress and antipsychotic drugs is an issue of great health concern, and both sex differences and age have to be considered as critical factors in this field of research.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Doug Frost, from the School of Medicine at the University of Maryland (Baltimore, USA) for his precious help and advice. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2009-10109, GRUPOS UCM-BSCH: 951579 and Red de trastornos adictivos RD06/0001/1013. A. Llorente-Berzal is a predoctoral fellow of the “Ministerio de Ciencia e Innovación”.

References

- Abel, K.M., Drake, R., Goldstein, J.M., 2010. Sex differences in schizophrenia. *Int. Rev. Psychiatry* 22, 417–428.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2008. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154, 1218–1226.
- Albaugh, V.L., Henry, C.R., Bello, N.T., Hajnal, A., Lynch, S.L., Halle, B., Lynch, C.J., 2006. Hormonal and metabolic effects of olanzapine and clozapine related to body weight in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 14, 36–51.
- Aman, M.G., Holloway, J.A., McDougall, C.J., Scallion, L., Tierney, E., McCracken, J.T., Arnold, L.E., Vitiello, B., Ritz, L., Gavalet, A., Cronin, P., Swiezy, N., Wheeler, C., Koenig, K., Chuman, J.K., Posey, D.J., 2008. Cognitive effects of risperidone in children with autism and irritable behavior. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 18, 227–236.
- Anavi-Goffer, S., Mulder, J., 2009. The polarised life of the endocannabinoid system in CNS development. *Chemobiochem* 10, 1591–1598.
- Britton, K.T., Segal, D.S., Kuczenski, R., Hauger, R., 1992. Dissociation between in vivo hippocampal norepinephrine response and behavioral/neuroendocrine responses to noise stress in rats. *Brain Res.* 574, 125–130.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14515–14520.
- Cichewicz, D.L., Haller, V.L., Welch, S.P., 2001. Changes in opioid and cannabinoid receptor protein following short-term combination treatment with delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 121–127.
- Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R., 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 8853–8860.
- Csomor, P.A., Yee, B.K., Vollenweider, F.X., Feldon, J., Nicolet, T., Quednow, B.B., 2008. On the influence of baseline startle reactivity on the indexation of prepulse inhibition. *Behav. Neurosci.* 122, 885–900.
- Didriksen, M., Kreilgaard, M., Arnt, J., 2006. Sertindole, in contrast to clozapine and olanzapine, does not disrupt water maze performance after acute or chronic treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 542, 108–115.
- Dix, S.L., Aggleton, J.P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav. Brain Res.* 99, 191–200.
- Drolet, G., Proulx, K., Pearson, D., Rochford, J., Deschepper, C.F., 2002. Comparisons of behavioral and neurochemical characteristics between WKY, WKHA, and Wistar rat strains. *Neuropsychopharmacology* 27, 400–409.

- Egertova, M., Elphick, M.R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB₁. *J. Comp. Neurol.* 422, 159–171.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 2002. Early maternal deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 177–184.
- Ellenbroek, B.A., Derks, N., Park, H.J., 2005. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress* 8, 247–257.
- Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2003. Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clin. Neurosci. Res.* 3, 297–302.
- Ellingrod, V.L., Bishop, J.R., Moline, J., Lin, Y.C., Miller, D.D., 2007. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and increases in body mass index (BMI) from olanzapine treatment in persons with schizophrenia. *Psychopharmacol. Bull.* 40, 57–62.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59.
- Fernandez-Espejo, E., Viveros, M.P., Nunez, L., Ellenbroek, B.A., Rodriguez de Fonseca, F., 2009. Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 206, 531–549.
- Findling, R.L., Steiner, H., Weller, E.B., 2005. Use of antipsychotics in children and adolescents. *J. Clin. Psychiatry* 66 (Suppl. 7), 29–40.
- Geyer, M.A., Krebs-Thomson, K., Braff, D.L., Swerdlow, N.R., 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl.)* 156, 117–154.
- Geyer, M.A., Swerdlow, N.R., 2001. Measurement of startle response, prepulse inhibition, and habituation. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 8, Unit 8* 7.
- Grimsey, N.L., Goodfellow, C.E., Scotter, E.L., Dowie, M.J., Glass, M., Graham, E.S., 2008. Specific detection of CB₁ receptors; cannabinoid CB₁ receptor antibodies are not all created equal! *J. Neurosci. Methods* 171, 78–86.
- Hammond, R.S., Tull, L.E., Stackman, R.W., 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 26–34.
- Harkany, T., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L.A., Mackie, K., 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 83–92.
- Ito, H.T., Smith, S.E., Hsiao, E., Patterson, P.H., 2010. Maternal immune activation alters nonspatial information processing in the hippocampus of the adult offspring. *Brain Behav. Immun.* 24, 930–941.
- Kapur, S., VanderSpek, S.C., Brownlee, B.A., Nobrega, J.N., 2003. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 625–631.
- Krebs-Thomson, K., Giracello, D., Solis, A., Geyer, M.A., 2001. Post-weaning handling attenuates isolation-rearing induced disruptions of prepulse inhibition in rats. *Behav. Brain Res.* 120, 221–224.
- Laika, B., Leucht, S., Heres, S., Schneider, H., Steimer, W., 2010. Pharmacogenetics and olanzapine treatment: CYP1A2*1F and serotonergic polymorphisms influence therapeutic outcome. *Pharmacogenomics* 11, 20–29.
- Levin, E.D., Petro, A., Beatty, A., 2005. Olanzapine interactions with nicotine and mecamylamine in rats: effects on memory function. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 459–464.
- Levine, S., 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30, 939–946.
- Levine, S., Huchton, D.M., Wiener, S.G., Rosenfeld, P., 1991. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev. Psychobiol.* 24, 547–558.
- Lewis, D.A., Levitt, P., 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 409–432.
- Li, L., Du, Y., Li, N., Wu, X., Wu, Y., 2009. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 1157–1167.
- Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., López-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, M.P., Nadal, R., 2011. Sex dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment in adult rat behavior. *Addict. Biol.*, doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00318.x.
- Llorente, R., Arranz, L., Marco, E.M., Moreno, E., Puerto, M., Guaza, C., De la Fuente, M., Viveros, M.P., 2007. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoenocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 636–650.
- Llorente, R., Gallardo, M.L., Berzal, A.L., Prada, C., Garcia-Segura, L.M., Viveros, M.P., 2009. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 233–241.
- Llorente, R., Llorente-Berzal, A., Petrosino, S., Marco, E.M., Guaza, C., Prada, C., Lopez-Gallardo, M., Di Marzo, V., Viveros, M.P., 2008. Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. *Dev. Neurobiol.* 68, 1334–1347.
- Llorente, R., Miguel-Blanco, C., Aisa, B., Lachize, S., Borcel, E., Meijer, O.C., Ramirez, M.J., De Kloet, E.R., Viveros, M.P., 2011. Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J. Neuroendocrinol.* 23, 329–344.
- Marco, E.M., Adriani, W., Llorente, R., Laviola, G., Viveros, M.P., 2009. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 498–507.
- Marco, E.M., Macri, S., Laviola, G., 2011. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox. Res.* 19, 286–307.
- Marston, H.M., Young, J.W., Martin, F.D., Serpa, K.A., Moore, C.L., Wong, E.H., Gold, L., Meltzer, L.T., Azar, M.R., Geyer, M.A., Shahid, M., 2009. Asenapine effects in animal models of psychosis and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl.)* 206, 699–714.
- Mateos, B., Borcel, E., Loriga, R., Luesu, W., Bini, V., Llorente, R., Castelli, M., Viveros, M.P., 2011. Adolescent exposure to nicotine and/or the cannabinoid agonist CP 55,940 induces gender-dependent long-lasting memory impairments and changes in brain nicotinic and CB₁ cannabinoid receptors. *J. Psychopharmacol.*
- Millstein, R.A., Ralph, R.J., Yang, R.J., Holmes, A., 2006. Effects of repeated maternal separation on prepulse inhibition of startle across inbred mouse strains. *Genes Brain Behav.* 5, 346–354.
- Muller-Vahl, K.R., Emrich, H.M., 2008. Cannabis and schizophrenia: towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia. *Expert. Rev. Neurother.* 8, 1037–1048.
- Mumby, D.G., 2001. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav. Brain Res.* 127, 159–181.
- Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., Lehmann, H., 2002. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn. Mem.* 9, 49–57.
- Neill, J.C., Barnes, S., Cook, S., Grayson, B., Idris, N.F., McLean, S.L., Snigdha, S., Rajagopal, L., Harte, M.K., 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol. Ther.* 128, 419–432.
- Oomen, C.A., Girardi, C.E., Cahyadi, R., Verbeek, E.C., Krugers, H., Joels, M., Lucassen, P.J., 2009. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One* 4, e3675.
- Patz, M.D., Day, H.E., Burow, A., Campeau, S., 2006. Modulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis by caffeine. *Psychoneuroendocrinology* 31, 493–500.
- Perez-Costas, E., Guidetti, P., Melendez-Ferro, M., Kelley, J.J., Roberts, R.C., 2008. Neuroleptics and animal models: feasibility of oral treatment monitored by plasma levels and receptor occupancy assays. *J. Neural. Transm.* 115, 745–753.
- Pietropaolo, S., Crusio, W.E., 2009. Strain-dependent changes in acoustic startle response and its plasticity across adolescence in mice. *Behav. Genet.* 39, 623–631.
- Piontkewitz, Y., Assaf, Y., Weiner, I., 2009. Clozapine administration in adolescence prevents postpubertal emergence of brain structural pathology in an animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 66, 1038–1046.
- Pouzet, B., Mow, T., Kreilgaard, M., Velschow, S., 2003. Chronic treatment with antipsychotics in rats as a model for antipsychotic-induced weight gain in human. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 133–140.
- Riedel, G., Davies, S.N., 2005. Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 445–477.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiatry* 7, 609–616.
- Rosa, M.L., Silva, R.C., Moura-de-Carvalho, F.T., Brandao, M.L., Guimaraes, F.S., Del Bel, E.A., 2005. Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1691–1696.
- Schmidt, M.V., Levine, S., Alam, S., Harbich, D., Sterlemann, V., Ganea, K., de Kloet, E.R., Holsboer, F., Muller, M.B., 2006. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J. Neuroendocrinol.* 18, 865–874.
- Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P., 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 270, 3726–3731.
- Shobo, M., Yamada, H., Mihara, T., Kondo, Y., Irie, M., Harada, K., Ni, K., Matsuoka, N., Kayama, Y., 2011. Two models for weight gain and hyperphagia as side effects of atypical antipsychotics in male rats: validation with olanzapine and ziprasidone. *Behav. Brain Res.* 216, 561–568.
- Skarsfeldt, T., 1996. Differential effect of antipsychotics on place navigation of rats in the Morris water maze. A comparative study between novel and reference antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl.)* 124, 126–133.
- Stefanidis, A., Verty, A.N., Allen, A.M., Owens, N.C., Cowley, M.A., Oldfield, B.J., 2009. The role of thermogenesis in antipsychotic drug-induced weight gain. *Obesity (Silver Spring)* 17, 16–24.
- Suarez, J., Llorente, R., Romero-Zerbo, S.Y., Mateos, B., Bermudez-Silva, F.J., de Fonseca, F.R., Viveros, M.P., 2009. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB₁(1) and CB₂(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19, 623–632.
- Suarez, J., Rivera, P., Llorente, R., Romero-Zerbo, S.Y., Bermudez-Silva, F.J., de Fonseca, F.R., Viveros, M.P., 2010. Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. *Brain Res.* 1349, 162–173.
- Sucecki, D., Tufik, S., 1997. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *Am. J. Physiol.* 273, R1332–R1338.
- Sundram, S., Copolov, D., Dean, B., 2005. Clozapine decreases [³H] CP 55940 binding to the cannabinoid 1 receptor in the rat nucleus accumbens. *Naunyn. Schmiedeberg. Arch. Pharmacol.* 371, 428–433.

- Terry Jr., A.V., Warner, S.E., Vandenhuert, L., Pillai, A., Mahadik, S.P., Zhang, G., Bartlett, M.G., 2008. Negative effects of chronic oral chlorpromazine and olanzapine treatment on the performance of tasks designed to assess spatial learning and working memory in rats. *Neuroscience* 156, 1005–1016.
- Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K., 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 78, 43–50.
- Tyrka, A.R., Wier, L., Price, L.H., Ross, N., Anderson, G.M., Wilkinson, C.W., Carpenter, L.L., 2008. Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Biol. Psychiatry* 63, 1147–1154.
- Vitiello, B., Correll, C., van Zwieten-Boot, B., Zuddas, A., Parellada, M., Arango, C., 2009. Antipsychotics in children and adolescents: increasing use, evidence for efficacy and safety concerns. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19, 629–635.
- Viveros, M.P., de Fonseca, F.R., Bermudez-Silva, F.J., McPartland, J.M., 2008. Critical role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy metabolism, with phylogenetic, developmental, and pathophysiological implications. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 8, 220–230.
- Viveros, M.P., Diaz, F., Mateos, B., Rodriguez, N., Chowen, J.A., 2010a. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm. Behav.* 57, 405–414.
- Viveros, M.P., Llorente, R., Diaz, F., Romero-Zerbo, S.Y., Bermudez-Silva, F.J., Rodriguez de Fonseca, F., Argente, J., Chowen, J.A., 2010b. Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Horm. Behav.* 58, 808–819.
- Viveros, M.P., Llorente, R., Lopez-Gallardo, M., Suarez, J., Bermudez-Silva, F., De la Fuente, M., Rodriguez de Fonseca, F., Garcia-Segura, L.M., 2009. Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl. 1), S217–S226.
- Weber, M., Swerdlow, N.R., 2008. Rat strain differences in startle gating-disruptive effects of apomorphine occur with both acoustic and visual prepulses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 306–311.
- Weston-Green, K., Huang, X.F., Deng, C., 2010. Olanzapine treatment and metabolic dysfunction: a dose response study in female Sprague Dawley rats. *Behav. Brain Res.*
- Wiley, J.L., Kendler, S.H., Burston, J.J., Howard, D.R., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J., 2008. Antipsychotic-induced alterations in CB1 receptor-mediated G-protein signaling and in vivo pharmacology in rats. *Neuropharmacology* 55, 1183–1190.

